

**Weiterentwicklung eines *in vitro* Embryotoxizitätstests mit  
murinen embryonalen Stammzellen:  
Verwendung molekularer Marker zur Erfassung  
verschiedener Differenzierungsendpunkte**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

Des Fachbereichs Bio- und Geowissenschaften,

Landschaftsarchitektur

an der

Universität-GH Essen

vorgelegt von

Nicole zur Nieden

aus Dortmund

Juli 2002

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Genetik, FB 9, der Universität-GH Essen oder an einer anderen gleichwertigen Einrichtung durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Obe

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

3. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H-W. Denker

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: J. Wiegand

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 2002

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	i
Abkürzungsverzeichnis .....	iv
1 Einleitung .....	i
1.1 Embryonale Stammzellen und <i>in vitro</i> Embryotoxizität .....	1
1.2 Embryogenese .....	2
1.2.1 Differenzierungskapazität embryonaler Stammzellen <i>in vitro</i> .....	2
1.2.2 Kardiogenese .....	3
1.2.3 Neurogenese .....	5
1.2.3.1 Neurogenese <i>in vivo</i> .....	5
1.2.3.2 <i>In vitro</i> Differenzierung neuronaler Zellen aus ES Zellen .....	8
1.2.3.2.1 <i>In vitro</i> Differenzierung neuronaler Zellen mit <i>all-trans</i> Retinolsäure .....	9
1.2.3.2.2 <i>In vitro</i> Differenzierung neuronaler Zellen über Selektion .....	10
1.2.4 Entwicklung des Skeletts .....	10
1.2.4.1 Knochen und Osteogenese .....	11
1.2.4.2 Knorpel und Chondrogenese .....	15
1.3 Aufgabenstellung .....	19
2 Material .....	21
2.1 Zelllinien .....	21
2.2 Versuchstiere .....	21
2.3 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Medienadditive .....	21
2.4 Kulturmedien .....	22
2.5 Puffer und Lösungen .....	23
2.6 Testsubstanzen .....	24
2.7 Antikörper .....	24
2.7.1 Erster Antikörper .....	24
2.7.2 Zweiter Antikörper .....	24
2.8 Oligonukleotide .....	25
3 Methoden .....	27
3.1 Präparation des Gewebematerials .....	27
3.2 Zellkultur .....	28
3.2.1 Passagieren der Zellen .....	28
3.2.2 Bestimmung der Zellzahl .....	28
3.2.3 Kryokonservierung der Zellen .....	28
3.2.4 Differenzierung der ES Zellen zu Kardiomyozyten, Osteoblasten und Chondrozyten in hängenden Tropfen (Rudnicki und McBurney, 1987) .....	29
3.2.5 Differenzierung der ES Zellen zu Nervenzellen .....	30
3.2.5.1 Retinolsäure .....	30
3.2.5.2 Linienselektion .....	30
3.3 Der embryonale Stammzelltest .....	31
3.3.1 Differenzierungstest .....	31
3.3.2 MTT-Test .....	31
3.4 Isolation, Quantifizierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren .....	32
3.4.1 RNA-Isolation .....	32
3.4.2 Isolation von genomischer DNA .....	32
3.4.3 Quantifizierung von RNA .....	33
3.4.4 Quantifizierung von genomischer DNA .....	33
3.4.5 Reverse Transkription .....	33
3.4.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Mullis und Faloona, 1987) .....	34
3.4.7 Quantitative Real-time PCR (Heid et al., 1996) .....	34
3.5 Histochemische Methoden .....	35
3.5.1 Nachweis von Kalzium .....	35

3.5.1.1	Alizarinrot S .....	35
3.5.1.2	Versilbern der Kalziumsalze nach von Kossa .....	36
3.5.2	Färbung von Proteoglycanen mittels Alcian Blau .....	36
3.5.3	Immunhistochemische Färbung mit spezifischen Antikörpern .....	36
3.6	Metachromatischer Test mit 1,9-Dimethylmethylenblau (Farndale et al., 1982 ) .....	37
3.7	Fluorogene Nisslfärbung .....	37
3.8	Bestimmung der ALP-Aktivität .....	38
3.9	Biostatistik .....	38
3.9.1	Lineare Diskriminanzanalyse zur Auswertung des EST .....	38
3.9.2	Bestimmung der spezifischen Genexpressionen .....	39
3.9.3	Statistischer Vergleich .....	39
4	Ergebnisse .....	40
4.1	Allgemeine Differenzierung embryonaler Stammzellen – Expressionsabnahme des Pluripotenzmarkers Oct4 im Verlauf der Embryoid Body Differenzierung ....	40
4.2	Kardiogenese in embryonalen Stammzellen .....	41
4.2.1	Charakterisierung von Kardiomyozyten in Embryoid Bodies .....	42
4.2.2	Gewebespezifität des MHC Gens .....	43
4.2.3	Kinetische Analyse der MHC Expression .....	44
4.3	Neurogenese in embryonalen Stammzellen .....	46
4.3.1	Identifizierung von Markergenen für Nervenzellen .....	46
4.3.2	Induktion der Neurogenese mit <i>all-trans</i> Retinolsäure .....	47
4.3.2.1	Charakterisierung der über Retinolsäure induzierten Nervenzellen in Embryoid Bodies .....	47
4.3.2.2	Einfluss von Retinolsäure auf die Expression neuronaler und entwicklungsspezifischer Gene .....	50
4.3.2.3	Kinetische Analyse der Expression neuronaler und entwicklungsspezifischer Gene in Gegenwart von Retinolsäure .....	51
4.3.3	Induktion der Neurogenese über Selektion .....	53
4.3.3.1	Charakterisierung der über Selektion entstandenen Nervenzellen .....	53
4.3.3.2	Kinetische Analyse der Expression neuronaler und entwicklungsspezifischer Gene während der Selektion der neuronalen Linie .....	56
4.4	Entwicklung skelettaler Elemente in Embryoid Bodies .....	58
4.4.1	Osteogenese .....	58
4.4.1.1	Charakterisierung von Osteoblasten in Embryoid Bodies .....	59
4.4.1.2	Identifizierung von Markergenen für Knochengewebe .....	62
4.4.1.3	Einfluss von Medienzusätzen auf die Expression osteoblasten- und entwicklungsspezifischer Gene .....	63
4.4.1.3.1	Abhängigkeit der Genexpression von Zeitpunkt und Dauer der Supplementapplikation .....	63
4.4.1.3.2	Einfluss von VD <sub>3</sub> auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) .....	66
4.4.1.3.3	Kinetische Analyse der knochenspezifischen Genexpression während der EB Differenzierung .....	68
4.4.1.4	Veränderung der Osteogenese unter Einfluss von BMP-2 .....	70
4.4.2	Chondrogenese .....	72
4.4.2.1	Charakterisierung von Chondrozyten in Embryoid Bodies .....	72
4.4.2.2	Identifizierung von Markergenen für Knorpelgewebe .....	75
4.4.2.3	Einfluss der Medienadditive BMP-2, TGFβ1, Insulin und Ascorbinsäure auf die Expression chondrozyten- und entwicklungsspezifischer Gene .....	76
4.4.2.3.1	Abhängigkeit der Genexpression von BMP-2 .....	76
4.4.2.3.2	Synergistische Wirkung von BMP-2, TGFβ1, Insulin und Ascorbinsäure .....	77
4.4.2.3.3	Kinetische Analyse der knorpelspezifischen Genexpression während der EB Differenzierung .....	80
4.4.2.4	Bestimmung des Proteoglycangehalts in Embryoid Bodies .....	83
4.4.3	Simultane Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten .....	84
4.5	Der EST – Vergleich zwischen klassischer Auswertung und molekularer Ebene .....	86

4.5.1	Bestimmung der Endpunkte des EST für sechs Testsubstanzen .....	87
4.5.1.1	Penicillin G .....	87
4.5.1.2	5-Fluoruracil .....	89
4.5.1.3	Retinolsäure .....	90
4.5.1.4	Diphenylhydantoin.....	91
4.5.1.5	Valproinsäure .....	92
4.5.1.6	Thalidomid.....	93
4.5.2	Klassifizierung der Substanzen nach ihrem teratogenen Potential .....	94
4.5.2.1	Diskriminanzanalyse – drei Klassen der Embryotoxizität .....	94
4.5.2.2	Ursprungsgerade – zwei Klassen der Embryotoxizität .....	96
5	Diskussion .....	98
5.1	Kardiogenese .....	98
5.2	Neurogenese.....	99
5.2.1	Identifizierung von Markergenen für neurale Zellen .....	99
5.2.1.1	Induktion der Neurogenese mit <i>all-trans</i> Retinolsäure .....	101
5.2.1.2	Induktion der Neurogenese über Selektion .....	103
5.2.1.3	Vergleichende Analyse der Retinolsäure-induzierten Neurogenese und der Neurogenese über Selektion.....	105
5.3	Entwicklung skelettaler Elemente aus embryonalen Stammzellen .....	106
5.3.1	Osteogenese in Embryoid Bodies .....	106
5.3.1.1	Identifizierung von Markergenen für Osteoblasten.....	106
5.3.1.2	Einfluss der Medienzusätze auf die Osteogenese .....	108
5.3.1.3	Die sequentielle Regulation knorpelspezifischer Gene während der Osteogenese .....	112
5.3.1.4	Veränderung der Osteogenese durch BMP-2 .....	116
5.3.2	Die Chondrogenese in Embryoid Bodies .....	117
5.3.2.1	Identifizierung von Markergenen für Chondrozyten .....	117
5.3.2.2	Wachstumsfaktoren der TGF $\beta$ Superfamilie modulieren die Chondrogenese in Embryoid Bodies .....	118
5.3.2.2.1	Einfluss von BMP-2 .....	119
5.3.2.2.2	Synergistische Wirkung von BMP-2, TGF $\beta$ 1, Insulin und Ascorbinsäure .....	120
5.3.2.2.3	Die sequentielle Regulation der knorpelspezifischen Gene während der Chondrogenese .....	122
5.3.3	Simultane Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten.....	125
5.4	Der erweiterte embryonale Stammzell Test (EST) als Embryotoxizitätsmodell .....	126
6	Ausblick .....	134
7	Zusammenfassung .....	135
8	Literaturverzeichnis.....	137
	Veröffentlichungen .....	158
	Lebenslauf .....	159
	Erklärung.....	i

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Ascorbinsäure
ALP	alkalische Phosphatase
AMP	Adenosin-3', 5'-Monophosphat
ANF	<i>englisch</i> atrial natriuretic factor
AP	Aktivatorprotein
βGP	β-Glycerophosphat
bFGF	<i>englisch</i> basic fibroblast growth factor
BMP	<i>englisch</i> bone morphogenetic protein
Bp	Basenpaare
BSA	<i>englisch</i> bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
cAMP	<i>englisch</i> cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate, zyklisches Adenosin-3', 5'-Monophosphat
Cbfa	<i>englisch</i> Core binding factor alpha
cGMP	<i>englisch</i> cyclic guanosine-3', 5'-monophosphate, zyklisches Guanosin-3', 5'-Monophosphat
cDNA	<i>englisch</i> complementary DNA, komplementäre DNA
Col1A1	Kollagen Typ I Gen
Col2A1	Kollagen Typ II Gen
COMP	<i>englisch</i> cartilage oligomeric matrix protein
C <sub>T</sub>	<i>englisch</i> threshold cycle
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMMB	Dimethylmethylen Blau
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>englisch</i> Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	1,4- Dithiothreitol
EB	<i>englisch</i> Embryoid body, Embryonalkörperchen
EDTA	<i>englisch</i> ethylenediamin tetraacidic acid, Ethylendinitrilotetraessigsäure
EST	embryonaler Stammzell Test
ES Zellen	embryonale Stammzellen
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	<i>englisch</i> fetal calf serum, foetales Kälberserum
FETAX	<i>englisch</i> frog embryo teratogenesis assay: <i>Xenopus</i>
FGF	<i>englisch</i> fibroblast growth factor
g	Einheit der Schwerkraft
g	Gramm
GABA	<i>englisch</i> γ-amino-butyric acid, γ-Aminobuttersäure
GAG	Glycosaminoglycan
GAPDH	Glyzerinaldehyd- 3- Phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>englisch</i> glial fibrillary acidic protein, saures fibrilläres Gliaprotein
IC <sub>50</sub>	<i>englisch</i> inhibition concentration, Halbhemmkonzentration
IC <sub>50</sub> H	IC <sub>50</sub> Kontraktion
IC <sub>50</sub> K	IC <sub>50</sub> Kontraktion
IC <sub>50</sub> KN	IC <sub>50</sub> Knochen
IC <sub>50</sub> KP	IC <sub>50</sub> Knorpel
IC <sub>50</sub> N	IC <sub>50</sub> Nerven
IL-6	Interleukin 6
Ihh	<i>englisch</i> Indian hedgehog
ITSFn	Insulin, Transferrin, Selen und Fibronectin
kDa	Kilodalton
LIF	<i>englisch</i> leukemia inhibitory factor
M	Mol
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
mg	Milligramm
MHC	<i>englisch</i> myosin heavy chain
min	Minute
μg	Mikrogramm

ml	Milliliter
MLC-2v	<i>englisch</i> ventricle-specific myosin light chain 2
mM	Millimol
MM	<i>englisch</i> micromass
MOB	murine Osteoblasten
mRNA	<i>englisch</i> messenger RNA, Boten-RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyl Tetrazolium Bromid
n.d.	nicht determiniert
NF	Neurofilament
NFL	<i>englisch</i> neurofilament light
NFM	<i>englisch</i> neurofilament middle
NFH	<i>englisch</i> neurofilament heavy
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NP	natriuretisches Peptid
OECD	<i>englisch</i> Organisation for Economic Cooperation and Development
OSF	Osteoblastenspezifischer Faktor
p.a.	per Analyse
PBS	<i>englisch</i> phosphate buffered saline
p.c.	post coitum
PCR	<i>englisch</i> polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAR	Retinolsäure-Rezeptor
RNA	<i>englisch</i> ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-Rezeptor
s.c	subkutan
SDS	<i>englisch</i> sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
Sox	<i>englisch</i> sry related homeobox
ss	<i>englisch</i> single stranded, einzelsträngig
SYN	Synaptophysin
TAE	Tris-Azetat
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TGF	<i>englisch</i> Transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrosefaktor
TNSALP	<i>englisch</i> tissue <u>n</u> onspecific ALP, nicht gewebespezifische ALP
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTX	Tetrodotoxin
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VD <sub>3</sub>	1,25-OH Vitamin D <sub>3</sub>
VPA	Valproinsäure
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZEBET	Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung zum Ersatz von Tierversuchen
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Embryonale Stammzellen und *in vitro* Embryotoxizität

Auf dem Gebiet der Entwicklung neuer Chemikalien oder pharmazeutischer Produkte benutzt die Industrie Selektionsverfahren, um die Wirksamkeitsprofile und das toxikologische Potential neuer Substanzen zu identifizieren. Bei solchen Screeningverfahren werden sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* Testsysteme eingesetzt. Die Identifizierung toxischer Eigenschaften eines Wirkstoffkandidaten hat dabei oberste Priorität. Besonders die Embryotoxizität, die auf dem teratogenen Potential einer Substanz beruht und abnorme Embryogenese und Missbildungen auslöst, gehört zu den gefährlichsten Eigenschaften einer Substanz. Deshalb gibt es einen immer stärker werdenden Bedarf, Embryotoxizitätstests in die Selektionsverfahren mit einzubinden, auch um wenig vielversprechende Entwicklungskandidaten von der weiteren Entwicklung auszuschließen.

Embryotoxizitätstests wurden bisher nach OECD Richtlinien *in vivo* im Tiermodell durchgeführt [Brown et al., 1995]. Zur Eindämmung der Zahl der Tierversuche sind bis heute mehrere *in vitro* Systeme entwickelt worden, um das teratogene Potential eines Präparates zu testen. Diese Systeme verwenden entweder *in vitro* kultivierte Zelllinien, Kulturen dissoziierter Zellen von Extremitätenknospen und des Mittelhirns von Rattenembryonen (MM-Test, „Micromass“) oder ganze Embryos sowohl der Ratte [„whole embryo culture“, WEC – Steele et al., 1983] wie auch niederer Spezies wie *Xenopus* im FETAX Test [Brown et al., 1995; Scholz et al., 1998]. MM-Test und WEC bedienen sich sowohl quantitativer wie auch qualitativer Endpunkte, um die Teratogenität einer Substanz abzuschätzen. Letztendlich angewandt wurden sie aber nur selten, da ihre Prädiktivität nur zwischen 70 und 80% liegt [Genschow et al., 2002]. Sie sind obendrein teilweise sehr aufwendig und setzen zudem die Tötung trächtiger Tiere voraus.

Vielversprechend jedoch ist der embryonale Stammzell Test (EST) [Spielmann et al., 1997]. Dieses Testmodell zieht seinen Vorteil aus dem Potential pluripotenter embryonaler Stammzellen (ES Zellen) der Maus, *in vitro* spontan in terminal differenzierte somatische Zellen aller drei Keimblätter, unter anderem auch in kontrahierende Kardiomyozyten zu differenzieren [Doetschmann et al., 1985; Wobus et al., 1991; Heuer et al., 1994].

Der EST benutzt neben der pluripotenten ES Zelllinie D<sub>3</sub> die permanente differenzierte Fibroblasten Zelllinie 3T3.A31 [Laschinski et al., 1991; Spielmann et al., 1995]. Drei verschiedene Endpunkte werden analysiert, um das embryotoxische Potential von Chemikalien in die drei Klassen der *in vivo* Toxizität (nicht, schwach/moderat oder stark embryotoxisch) einzuordnen. Diese sind die Hemmung des Wachstums (Zytotoxizität) der (a) embryonalen ES Zellen (b) der



,erwachsenen' 3T3 Zellen nach einer Behandlungsdauer von 10 Tagen und (c) die Störung der Differenzierung von ES Zellen zu Kardiomyozyten ebenfalls nach einer Behandlungsdauer von 10 Tagen. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen werden erfasst und die Halbhemmkonzentrationen ( $IC_{50}$ ) für die drei genannten Endpunkte bestimmt. Die Auswertung erfolgt über ein biostatistisches auf Diskriminanzanalyse beruhendes Prädiktionsmodell, das bei der ZEBET (Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung zum Ersatz von Tierversuchen, angeschlossen an das Bundesgesundheitsministerium für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) entwickelt wurde [Spielmann et al., 1997]. Zur Validierung dieses Tests, die kürzlich in einem Ringversuch unterstützt von der EU unter der Leitung der ZEBET und unter Koordination des Europäischen Centers für die Validierung Alternativer Methoden (ECVAM) durchgeführt wurde, wurden 20 Chemikalien ausgewählt, deren teratogenes Potential *in vivo* bekannt war und auch ausreichend beschrieben wurde. Diese Chemikalien entstammen allesamt einer Liste, die von der amerikanischen Gesellschaft für Teratologie für die Validierung von *in vitro* Embryotoxizitätstests veröffentlicht wurde [Smith et al., 1983].

## **1.2 Embryogenese**

### **1.2.1 Differenzierungskapazität embryonaler Stammzellen *in vitro***

Embryonale Stammzellen sind kontinuierlich wachsende Zelllinien embryonalen Ursprungs, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste der Maus isoliert werden [Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981]. Charakteristische Eigenschaften dieser Zellen sind ihre nahezu unlimitierte Selbsterneuerungskapazität und die Expression von Pluripotenzenmarkern wie alkalische Phosphatase und des keimlinienspezifischen Transkriptionsfaktors Oct4 [Wobus, 2000; Resnick et al., 1992; Schöler et al., 1989; Rosner et al., 1990].

*In vivo* stellen ES Zellen ihr entwicklungsspezifisches Potential mit der Fähigkeit unter Beweis durch homologe Rekombination zur Keimlinie beizutragen [Bradley et al., 1984; Thomas und Capecchi, 1987; Labosky et al., 1994]. Werden sie subkutan in Mäuse re-appliziert, entwickeln sich Tumore, deren histologische Analyse endodermähnliche Zellen, Nervengewebe und keratinisierende Epithelien (ektodermal), Muskelgewebe, Blutgefäße und Knorpel (mesodermal) zeigt [Wobus et al., 1984].

Die Proliferation der ES Zellen wird durch Zytokine der Interleukin 6 (IL-6) Superfamilie kontrolliert [Yoshida et al., 1994]. Unter dem Einfluss des „Leukemia Inhibitory Factors“ (LIF), einem polyfunktionalen pleiotropen Hormon der IL-6 Klasse, können ES Zellen *in vitro* in einem undifferenzierten Stadium in Kultur gehalten werden, ohne dass sie ihr pluripotentes Potential verlieren [Auernhammer und Melmed, 2000; Williams et al., 1988]. Dieser Faktor ist essentiell für

die Inhibierung der Differenzierung pluripotenter Stammzellen und die Wachstumsförderung primordialer Keimzellen. Zusätzlich zu ihrem pluripotenten Potential *in vivo*, sind ES Zellen in der Lage *in vitro* in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Wird den ES Zellen der inhibierende Faktor LIF entzogen, geschieht ein faszinierender Schritt in ihrer Entwicklung, in dem sich die Zellen zu kleinen Aggregaten, den sogenannten Embryonalkörperchen (Embryoid Bodies = EBs) zusammenschließen. In diesen entwickeln sich ebenso wie *in vivo* Zelltypen aller drei Keimblätter, die miteinander interagieren und verschiedene organähnliche Strukturen bilden [Chen et al., 1992]. *In vivo* entwickelt sich aus der inneren Zellmasse der Blastozyste das primitive Ektoderm. Während der Gastrulation entwickelt sich dann aus dem primitiven Ektoderm das Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. EBs rekapitulieren viele dieser Prozesse, die während der Embryonalentwicklung stattfinden [Doetschmann et al., 1985]. Sogar einige Kinetiken entsprechen denen, die in einem sich entwickelnden Embryo beobachtet werden [Leahy et al., 1999].

Auch Markergene für frühe embryonale Linien wie Neuroektoderm, Endoderm und Mesoderm sind in einer geregelten zeitlichen Abfolge während der EB Entwicklung exprimiert. So werden während der ersten zwei Tage der EB Entwicklung die Gene *Oct3* und *FGF-5* transkribiert, welche *in vivo* vorherrschend während der Prägastrulationsphase vor der Implantation des Embryos exprimiert werden (4,5-6,5 p.c.). Diese Phase wird an den Tagen 2-5 der EB Entwicklung gefolgt von der Expression vieler Gene, die für die frühe Postimplantationsphase *in vivo* kennzeichnend sind (6,5-7,0 p.c.). Zu ihnen zählen die endodermalen Gene *hHNF1*, *HNF3 $\beta$*  und *HNF4*, die frühen mesodermalen Marker *Brachyury*, *gooseoid* und *BMP-4*. *Brachyury*, das *in vivo* während der Gastrulation im Embryo exprimiert wird, zeigt seine Maximaexpression am Tag 4 der ES Differenzierung und wird an Tag 5 wieder herunterreguliert, wenn die ersten gewebespezifischen Gene hochreguliert werden. Gene, die die frühe neuroektodermale Entwicklung kennzeichnen, wie *Pax-6* und *Mash-1*, werden sogar schon an Tag 1 der EB Differenzierung exprimiert [Leahy et al., 1999; Rohwedel et al., 2001].

Aus den genannten Gründen kann die EB Differenzierung *in vitro* dazu herangezogen werden, inhibierende oder induzierende Effekte auf die Differenzierungsprozesse früher embryonaler Stadien zu studieren, besonders auf die Bildung neuroektodermaler und mesodermaler Zellen.

### 1.2.2 Kardiogenese

*In vivo* ist das Herz das erste Organ, das während der murinen Embryogenese gebildet wird. Herzmuskelzellen entwickeln sich aus dem lateralen Mesoderm zu einem frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung [Han et al., 1992]. Zwischen Tag 7,5 und 8 p.c. wird die Generation eines primitiven einzelnen Herzstranges initiiert, dessen Kontraktionen zum ersten Mal an Tag 8,5 – 9 p.c. auftreten [Fishman und Chien, 1997]. Während das Herz allgemein weiteren Änderungen während der folgenden Entwicklungsstadien unterliegt, sind die essentiellen Komponenten, die für

die Initiierung der rhythmischen kontraktile Aktivität verantwortlich sind, bereits zu diesem frühen Zeitpunkt etabliert. So sind etwa die ersten Transkripte sarkomerer kontraktile Proteine bereits an Tag 7,5 p.c. nachweisbar, wie das  $\alpha$ -Aktin [Sassoon et al., 1988; Sanchez et al., 1991].

Über die Rolle von Faktoren, die in die Kardiogenese eingreifen, ist bis heute nicht sehr viel bekannt. Der Wachstumsfaktor IGF-1 (Insulin like Growth Factor) und die Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und MEF2C scheinen für die Ausbildung eines funktionstüchtigen Herzens essentiell zu sein [Fishman und Chien, 1997]. Zur Entwicklung des präkardialen Mesoderms bei Primaten tragen unter anderem bFGF (basic fibroblast growth factor), Insulin und IGFs bei, wobei eine Kombination aus BMP-2 (bone morphogenetic protein) und FGF-4 (fibroblast growth factor) die Kardiogenese von nicht präkardialen Mesoderm induziert [Antin et al., 1996; Lough et al., 1996]. TGF $\beta_1$  stimuliert außerdem die Bildung des kardialen Mesoderms und bFGF ist in die autoregulatorischen Proliferations- und Differenzierungsprozesse der Kardiomyozyten involviert [Muslin und Williams, 1991; Consigli und Joseph-Silverstein, 1991].

Die Differenzierung von Kardiomyozyten *in vitro* aus Embryoid Bodies repräsentiert ebenfalls einen Prozess kontrollierter Genexpression. Während der kardialen Myofibrillogenese werden sarkomerische Proteine in der folgenden zeitlichen Abfolge organisiert: Titin (Z-Scheiben),  $\alpha$ -Aktinin, Myomesin, Titin (M-Bande), Myosin Heavy Chain (MHC), kardiales Troponin T und M-Protein, was die sarkomere Entwicklung *in vivo* rekapituliert [Guan et al., 1999]. Die myofibrilläre Organisation nimmt zu, indem sich Zellen mit keiner oder nur geringer myofibrillärer Ordnung zu Myokardzellen mit hoch orientierten Fibrillen entwickeln [Sanger et al., 1984]. Während dieses Prozesses ändert sich auch Form und Größe der Zellen, so wie ihre elektrophysiologischen Eigenschaften. Die von ES Zellen abstammenden Kardiomyozyten zeigen Aktionspotentiale, die denen von Zellen aus dem Sinusknoten, dem Atrium und dem Ventrikel, also erwachsener Kardiomyozyten, gleichen [Maltsev et al., 1993]. Undifferenzierte Stammzellen dagegen sind elektrisch nicht aktiv, denn sie sind nicht in der Lage, Aktionspotentiale zu generieren [Kleppisch et al., 1993]. Die unterschiedlichen Formen der Aktionspotentiale der Kardiomyozyten in EBs verschiedener Entwicklungsstadien korrelieren mit der Expression spezialisierter Ionenkanäle [Maltsev et al., 1994].

Herzspezifische Gene, die während der Embryogenese temporal regulierte Expressionsmuster zeigen, werden auch während der EB Differenzierung in einem ähnlichen Muster exprimiert. Der Transkriptionsfaktor Nkx2.5, der von kardialen Vorläuferzellen *in vivo* exprimiert wird, ist das erste herzspezifische Gen, das während der EB Entwicklung exprimiert wird. Parallel dazu verläuft die Expression der  $\alpha_1$ -Untereinheit des L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanals, gefolgt von der Expression des kardialen Myosin Heavy Chain (MHC) Gens [Fässler et al., 1996; Wobus und Guan, 1998]. Das MHC ist das Hauptprotein des kontraktile Apparates, das bei Vertebraten von einer Multigenfamilie kodiert

wird. Im Säugerherzen werden zwei Isoformen, das  $\alpha$ - und das  $\beta$ -MHC exprimiert, deren Koexpression *in vivo* charakteristisch für ventrikuläre und atriale Zellen während der frühen embryonalen Herzentwicklung ist [Lompre et al., 1984]. Ihre relativen Proportionen hängen von der Entwicklungsstufe, dem physiologischen Zustand des Gewebes und der Region des Herzens ab [Lompre et al., 1984; Mahdavi et al., 1984]. Die  $\beta$ -Isoform, die eine geringere ATPase Aktivität aufweist, ist die dominierende Form im späten Nagetierembryo, wird jedoch postnatal von der  $\alpha$ -Isoform abgelöst. Beim Menschen überwiegt  $\beta$ -Form im erwachsenen Herzen [Hoh et al., 1978]. In der terminalen Differenzierungsphase können Gene, die in spezialisierten Atrium- oder Ventrikelzellen exprimiert werden, wie ANF (atrial natriuretic factor) und MLC-2v (ventricle-specific myosin light chain 2) detektiert werden [Fässler et al., 1996]. In situ Analysen an 8 Tage alten Mäuseembryonen zeigten, dass MLC-2v exklusiv in der Ventrikelregion des primitiven Herzstranges exprimiert wird, ein Zeichen dafür, dass die ventrikuläre Spezifizierung schon vor der Anlage des Septums und der Entwicklung distinkter Atrium und Ventrikelkammern vollzogen wird [O'Brien et al., 1993].

Die Kardiogenese im EB spiegelt somit die Prozesse der *in vivo* Kardiogenese wieder. Die charakteristischen Eigenschaften adulter Kardiomyozyten zeigen sich auch in den Kardiomyozyten, die aus den ES Zellen hervorgehen.

### 1.2.3 Neurogenese

#### 1.2.3.1 Neurogenese *in vivo*

Das zweite Hauptorgan, das sich während der Embryogenese formiert, ist das Gehirn, bzw. das zentrale Nervensystem (ZNS), eine komplexe Struktur, in der Neurone und Gliazellen miteinander kommunizieren und Netzwerke ausbilden. Bereits ab Tag 7,75 p.c. der Embryonalentwicklung können Marker für neurale Vorläuferzellen nachgewiesen werden [Dahlstrand et al., 1995].

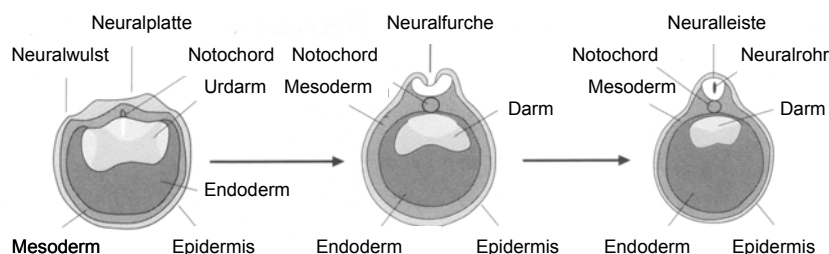


Abb. 1.: Neurulation beim Frosch, stellvertretend für alle Vertebraten. Querschnitte von drei Embryonen zu verschiedenen Stadien. Nach Campos-Ortega, 1996.

Das Nervensystem entwickelt sich während der Embryogenese aus dem Neuroektoderm, welches wahrscheinlich unter dem Einfluss des Mesoderms aus dem mittleren Ektoderm entsteht [Bain et al., 1995]. Das Neuroektoderm entwickelt sich zur Neuralplatte. Bei vielen Säugern senkt sich diese zur Bildung einer neuralen Furche (Abb. 1), die sich anschließend mittels morphogenetischer Bewegung zu einem Neuralrohr, umgeben von der Neuralleiste, schließt. Die Zellen der Neuralleiste differenzieren im weiteren Verlauf der Neurogenese zu Neuronen und Gliazellen.

Ein charakteristischer Marker für neuronale Zellen ist die neuronenspezifische Enolase, ein Isoenzym der glycolytischen Enolase, die 2-Phosphoglycerat in Phosphoenolpyruvat umwandelt und exklusiv in postmitotischen Neuronen exprimiert wird [Alouani et al., 1993]. Ihre typische polarisierte Form verdanken die Neurone einem extensiven Zytoskelett, bestehend aus intermediären Filamenten und Mikrotubuli.

Die Neurofilamente (NF), als die neuronenspezifischen intermediären Filamente sind die wesentlichen Zytoskelettelemente in Axonen und bestehen aus drei ähnlichen Filamentbausteinen unterschiedlicher molekularer Masse, dem NFL (light – 68 kDa), NFM (middle – 160 kDa) und dem NFH (heavy – 200 kDa). Alle Neurofilamente sind typischerweise 10 nm lang und direkt in die Kontrolle von Wachstum und Form der Axone involviert [Steinert und Roop, 1988; Cote et al., 1993; Xu et al., 1993]. NFL und NFM werden während der frühen Entwicklung postmitotischer neuronaler Zellen exprimiert, NFH dagegen erst wesentlich später [Julien et al., 1986; Lieberburg et al., 1989]. Bei Säugern werden die drei Untereinheiten von drei verschiedenen Genen kodiert, die alle mehrere negative und positive regulatorische *Cis*-Elemente enthalten. Die regulatorischen Elemente scheinen die Transkription dieser Gene zu kontrollieren [Hsu et al., 1995]. Bisher ist es nicht gelungen, die spezifischen Faktoren zu identifizieren, die diese *Cis*-Elemente in neuronalen Zellen anschalten.

Mikrotubuli sind ein weiterer elementarer Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts [Tam, 1990]. Sie sind mit den sogenannten Mikrotubuli assoziierten Proteinen (MAP) assoziiert, die die Polymerisation des Tubulins, die Ausbildung und Funktion der Mikrotubuli und die Kreuzvernetzung untereinander und mit den Neurofilamenten kontrollieren und so für die Induktion der neuronalen Polarität sorgen [Murphy et al., 1977; Bloom und Vallee, 1983; Gonzalez-Billault et al., 2002]. MAPs werden sowohl im zentralen wie auch im peripheren Nervensystem exprimiert. Das häufigste MAP ist das MAP-2, das während der gesamten neuronalen Entwicklung exprimiert wird.

Nach Ausbildung der Dendriten und Axone bilden die neuronalen Zellen untereinander Synapsen. Reife Neurone weisen zwei distinkte regulatorische Sekretionsvesikel auf, die großen Granula und die kleinen synaptischen Vesikel. Die synaptischen Vesikel finden sich sowohl in Neuronen wie auch in neuroendokrinen Zellen. Man geht davon aus, dass die exozytotische Freisetzung

vesikulärer Inhaltsstoffe über die Ausbildung von kanalbildenden Proteinstrukturen abläuft. Möglicherweise kommt dem Synaptophysin, einem 38kDa kalziumbindenden Glycoprotein, dabei eine Rolle zu. Es kann homooligomere Komplexe und Membranporen ausbilden und hilft so bei der Sekretion der löslichen Inhaltsstoffe der synaptischen Vesikel [Navone et al., 1986; Thomas et al., 1988; Wiedenmann und Franke, 1985].

Gliazellen teilen sich in zwei Klassen, die Astrozyten und die Oligodendrozyten. Die Astrozyten wiederum können in zwei Typen von Astrozyten, Typ I und Typ II, unterschieden werden. Die Gliazellen gehören zwei unterschiedlichen Stammbäumen an: Die Oligodendrozyten und die Typ II Astrozyten stammen aus gemeinsamen Vorläuferzellen, den O2A-Zellen, die Typ I Astrozyten dagegen aus einer anderen Vorläuferzelle. Typ II Astrozyten werden durch äußere Faktoren induziert, während die Entwicklungsbahn der Oligodendrozyten konstitutiv ist und erst dann eingeleitet wird, wenn kein weiteres Signal vorhanden ist, das die Umleitung der O2A-Zelle in Richtung der Astrozytenbahn bewirkt [Campos-Ortega, 1996]. In Richtung der Oligodendrozytenbahn entstehen aus den bipolaren O2A Vorläufern über multipolare späte Vorläuferzellen die Prä-Oligodendroblasten.

Typ I und Typ II Astrozyten stehen in engem Kontakt mit allen Zelltypen des Gehirns [Laping et al., 1994]. Obwohl man ihnen anfänglich nur eine unterstützende Rolle im Gehirn zuschrieb, wurden ihnen später neue Rollen zugesprochen, wie die Aufnahme von Transmittern, die Synthese und Sekretion trophischer Faktoren, die Regulation der synaptischen Dichte und die Regulation des zerebralen Blutflusses [Kimelberg und Katz, 1985; Frei et al., 1985; Furukawa et al., 1986; Eddleston und Mucke, 1993; Meshul et al., 1987; Paulsson et al., 1987]. Ihre Fortsätze nahe den Synapsen sind in die Regulation der Neurosekretion involviert.

Astrozyten beinhalten wie die Neurone ebenfalls charakteristische intermediäre Filamente, die sogenannten Gliafilamente, welche große Polymere des glial fibrillary acidic protein (GFAP, saures fibrilläres Gliaprotein) darstellen. Das GFAP besteht im Gegensatz zu den Neurofilamenten aus nur einem einzigen Baustein von 48kDa, welches meist 8-9 nm lang ist und die Beweglichkeit der Astrozyten sowie ihre Form moduliert, indem es den Zellfortsätzen strukturelle Stabilität verleiht [Sakai et al., 1990; Eng et al., 2000].

Oligodendrozyten sind die myelinbildenden Zellen des adulten Säuger-ZNS. Schon die unreifen Prä-Oligodendroblasten synthetisieren Galactocerebroside und Sulfatide, zwei typische Differenzierungsmarker. Die terminale Differenzierung der Oligodendrozyten ist aber erst abgeschlossen, wenn sie Marker des Myelinisierungsprozesses, wie das Proteolipidprotein oder das Myelin assoziierte Protein exprimieren [Gu et al., 1997]. Zusätzlich zu ihrer Rolle als strukturelle Komponenten des Myelins, sind die Galactocerebroside und Sulfatide an der Regulation der Oligodendrozyten Differenzierung beteiligt, indem sie als Transmitter wirken [Bansal et al., 1999].

Die komplexe Entwicklung des Säuger-Nervensystems wird während der Embryogenese und dem frühen postnatalen Leben von einem intrinsischen zellulären Programm, sowie von einer Reihe epigenetischer und endogener zellulärer Signale kontrolliert [McKay, 1989; Luskin, 1994]. Da das Nervensystem jedoch in einem komplexen Umfeld differenziert, das relativ unerreichbar für experimentelle Manipulationen ist, ist relativ wenig über die intrinsischen Faktoren bekannt, die den ultimativen Phänotyp der Nervenzellen determinieren.

Das komplexe Entwicklungsprogramm wird durch ein spezifisches räumliches und zeitliches Expressionsmuster von Genen charakterisiert, die Zellidentität und –funktion kontrollieren. Während der frühen Entwicklung des Nervensystems spielen die Gene *wnt-1*, *Hox-1.6*, *En-2* und *mash-1* eine Rolle [Thomas und Cappechi, 1990; Lufkin et al., 1991; Joyner et al., 1991]. Der Transkriptionsfaktor Sox2 gilt als spezifischer Marker neuronaler Vorläuferzellen. Der Name kommt von der in seiner Sequenz enthaltenen SRY verwandten Hydroxymethylglutaryl (HMG) Box DNA-Bindungsdomäne. Er wird während der Embryogenese im Neuroepithel der Neuralplatte und sich teilenden neuronalen Vorläuferzellen exprimiert, aber auch in frühen Zellen der Neuralleiste [Collignon, 1992].

#### **1.2.3.2 *In vitro* Differenzierung neuronaler Zellen aus ES Zellen**

Im Hinblick auf die neuronale Differenzierung *in vitro*, ist das Expressionsmuster nervenzell-spezifischer Gene stark abhängig von den Kulturbedingungen. Obwohl die spontane Differenzierung der ES Zellen zu Nervenzellen unter Einfluss von FCS nur gering ist, können sehr wohl Transkripte neuronenspezifischer Gene nachgewiesen werden [Strübing et al., 1995; Schmidt et al., 2001]. Bis dato wurden spezifische Protokolle etabliert, um die Differenzierung zu neuronalen Zellen aus ES Zellen zu erhöhen, etwa die Induktion mit Retinolsäure und die Selektion der neuronalen Differenzierungslinie. Retinolsäureapplikation führte zu einer effizienten Generierung neuronaler Zellen, begleitet von der Expression gewebespezifischer Gene, Proteine, Ionenkanäle und Rezeptoren, die in einer entwicklungsabhängigen Weise kontrolliert werden. Da jedoch das Entwicklungsmuster und die Überlebenskapazität der von Retinolsäure induzierten neuronalen Zellen limitiert ist, wurden spezifische Differenzierungsprotokolle über Selektion der neuronalen Vorläuferzellen mit Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixmolekülen entwickelt. Nachdem sich die drei Keimblätter während der EB Entwicklung gebildet haben, wird die mesodermale Entwicklung durch Entzug von Serum von Tag 6 an inhibiert und neuronale Vorläuferzellen werden über den Zusatz des Wachstumsfaktors bFGF generiert. Retinolsäure und Wachstumsfaktor induzierte Differenzierung zeigen unterschiedliche genetische Muster [Rolletschek et al., 2001].

#### 1.2.3.2.1 *In vitro* Differenzierung neuronaler Zellen mit all-trans Retinolsäure

Retinolsäure ist ein Molekül mit einer breiten biologischen Aktivität, die in allen Vertebraten vorkommt. Abhängig von der Konzentration reichen die zelluläre Antworten auf Retinolsäure *in vitro* vom Zelltod bis zur induzierten Differenzierung. Die Mechanismen, über die Retinolsäure seine multiplen Effekte induziert, sind hoch komplex. Retinolrezeptoren spielen dabei eine bedeutende Rolle. Zwei Klassen von Retinolrezeptoren konnten bisher identifiziert werden, die Retinolsäurerezeptoren (RARs) und die Retinoidrezeptoren (RXRs). Transkripte für RARs, RXR $\alpha$  und RXR $\beta$ , sind bereits in ES Zellen nachgewiesen worden [Bain et al., 1994]. Ihre Expression kann durch Retinolsäure selbst induziert werden [Leroy et al., 1991; Zelent et al., 1991; Kastner et al., 1990].

*In vitro* induziert Retinolsäure neuronale Differenzierung in isolierten Zellen aus der Neuralleiste, humanen Neuroblastomazellen oder auch humanen embryonalen Karzinomzellen [Henion und Weston, 1994; Cervello et al., 1997; Przyborski et al., 2000]. Wird Retinolsäure zu frühen Zeitpunkten der Entwicklung, wenn die neuroektodermalen Zellen in den EBs gebildet werden (zwischen Tag 1 und 5), auf ES Zellen appliziert, induziert sie konzentrations- und zeitabhängig unter anderem die Differenzierung neuronaler, aber auch kardialer, myogener, adipogener und glatter Muskelzellen [Rohwedel et al., 1999; Wobus et al., 1994; Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strübing et al., 1995]. Die Frequenz spontan auftretender neuronaler Differenzierung liegt bei etwa 15-30% der EBs und kann über die Zugabe von Retinolsäure auf nahezu 100% angehoben werden [Strübing et al., 1995]. Die mit Retinolsäure induzierten neuronalen Zellen zeigen viele Eigenschaften ausgewachsener Neurone. Gene, die für die 68-kDa und 160-kDa Neurofilamente und auch Synaptophysin kodieren, werden bereits in sehr frühen Phasen der EB Entwicklung exprimiert. In dieser frühen Phase exprimieren die neuronalen Zellen auch schon verschiedene Typen spannungsabhängiger K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> Kanäle, wie auch hoch sensible TTX-sensitive ‚neuronale‘ Na<sup>+</sup> Kanäle [Strübing et al., 1995]. Die Ca<sup>2+</sup> Ströme werden über N- und P-Typ Kanäle generiert, wie sie in neuronalen und neuroendokrinen Zellen vorkommen [Mintz und Bean, 1992; Scherübl et al., 1993]. Bei weiterer Differenzierung erhöht sich die Dichte der spannungsabhängigen Ionenkanäle und ligandengesteuerte Ionenkanäle werden dem Kanalmuster hinzugefügt. Als Liganden wurden GABA<sub>A</sub>, Glycin, Kainat, AMPA und NMDA nachgewiesen, die haupt-inhibitorischen und -erregenden Neurotransmitter im ZNS. Das späte Muster der Ionenkanalexpression wird begleitet von der Expression charakteristischer Proteine für terminale Neurone, NFL, NFM, NFH, MAP-2 und Synaptophysin [Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strübing et al., 1995; Finley et al., 1996]. Neben neuronalen Zellen können auch Gliazellen aus Retinolsäure induzierten ES Zellen differenziert werden, die Expression von Markern für Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia aufweisen [Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Angelov et al., 1995].



#### 1.2.3.2.2 *In vitro Differenzierung neuronaler Zellen über Selektion*

Auf der Basis eines Protokolls nach Okabe et al. [1996] sind viele effiziente Protokolle zur Generierung von neuronalen Zellen durch Linienselektion etabliert worden. Sie beinhalten I) Bildung aller drei Keimblätter in EBs, II) selektive Differenzierung neuroektodermaler Zellen und Inhibierung mesodermaler Zellen durch Entzug der im FCS enthaltenen Wachstumsfaktoren, III) die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen durch induktive Faktoren, wie bFGF und schließlich IV) die Differenzierungsinduktion funktioneller Neurone und Gliazellen mit neuralen Induktionsfaktoren und Entzug des bFGF. In einer frühen Phase der Kultur, charakterisiert durch die Proliferation neuraler Vorläuferzellen, wird Nestin exprimiert, ein intermediäres Filament, welches in hohem Maße in neuroepithelialen Stammzellen vorkommt. Parallel dazu werden die Transkriptionsfaktoren MASH-1, En-1, Pax2 und Wnt-1 exprimiert [Okabe et al., 1996; Lee et al., 2000]. In Phase IV wird die Erniedrigung der Nestin und *mash-1* Expression gefolgt von einer Hochregulation des NFM, Synaptophysin und GFAP. Reife neuronale Zellen können überdies identifiziert werden, da sie die Neurotransmitter Dopamin, Serotonin, GABA und Glutamat produzieren. Schließlich finden sich auch Oligodendrozyten zu späteren Stadien ab Kulturwoche vier [Okabe et al., 1996; Lee et al., 2000; Rolletschek et al., 2001].

Die neuronalen Zellen, die bei Anwendung des Selektionsprotokolls entstehen, zeigen ebenfalls elektrophysiologische Eigenschaften, die denen pränataler Neurone gleichen [Okabe et al., 1996]. Die in ihnen gemessenen Ionenströme scheinen durch auswärtsgleichrichtende  $K^+$ -Kanäle vermittelt zu werden. Die synaptische Ströme lassen sich in erregend und inhibitorisch gliedern.

#### 1.2.4 Entwicklung des Skeletts

Im Vergleich zur Kardio- und Neurogenese tritt die Entwicklung des Skeletts erst in einer späteren Phase der Embryonalentwicklung auf. Das Skelett hat wie jedes andere Organ spezifische entwicklungsbiologische und funktionale Charakteristiken, die seine Identität im biologischen und pathologischen Sinne definieren. Es besteht aus multiplen Elementen verschiedener Formen und Ursprünge verteilt im ganzen Körper. Die meisten dieser skelettalen Elemente werden von zwei verschiedenen Geweben geformt, dem Knorpel und dem Knochen. Jeder dieser Gewebetypen ist durch seine speziellen Zelltypen charakterisiert, die Osteoblasten und Osteoklasten im Knochen und die Chondrozyten im Knorpel. Beide entstehen aus Osteo- oder Chondrovorläuferzellen, die erst dann zu identifizieren sind, wenn sie kurz davor stehen, das jeweilige Gewebe zu bilden. Beide Zelltypen sind spindelförmig und fibroblastenähnlich, mit großen sphärischen Kernen und relativ wenig Zytoplasma.

### 1.2.4.1 Knochen und Osteogenese

Knochen ist ein spezialisiertes konnektives Gewebe mit der Eigenschaft in einem physiologischen Prozess, der Knochenmineralisierung, zu kalzifizieren [Termine et al., 1980].

Bei Säugetieren ist die Knochenentwicklung ein spätes embryonales Ereignis. Nachdem sich die mesenchymale Kondensation, die jeder skelettalen Entwicklung vorangeht, zwischen Tag 10,5 und Tag 12,5 p.c. bei der Maus vollzogen hat, kann die Entwicklung der skelettalen Elemente auf zwei Wegen weiterschreiten. Entweder differenzieren die Zellen der mesenchymalen Kondensation direkt zu Osteoblasten (intramembranöse Ossifikation), die etwa an Tag 15,5 der Embryonalentwicklung erscheinen [Hall und Miyake, 1992; Huang et al., 1997] oder sie differenzieren zu Chondrozyten, die dann die knorpeligen Anlagen der zukünftigen Knochen bilden. In der Peripherie dieser Anlagen differenzieren Zellen zu Osteoblasten, während der andere Teil zu hypertrophen Chondrozyten wird. Diese Prozesse werden unter dem Begriff endochondrale Ossifikation subsummiert. Die Osteoblasten sind die Zellen, die für die Deposition der Knochenmatrix oder den Knochenaufbau verantwortlich sind. Ist die Knochenmatrix erst einmal abgelagert, formiert sich das Knochenmark und die ersten Osteoklasten erscheinen. Die Osteoblasten produzieren die Matrix, Zytokine und Aktivatoren für die Osteoklasten, die wiederum konstant die entstandene Matrix modifizieren.

Bis heute wurden erst zwei Gene identifiziert, die den Differenzierungsprozess der Osteoblasten kontrollieren: Core binding factor alpha 1 (*Cbfa1*), auch osteoblastenspezifischer Faktor 2 genannt (*Osf2*), und Indian hedgehog (*Ihh*).

*Cbfa1* ist der früheste und spezifischste Marker der Knochenentwicklung. Es reguliert zentral die Differenzierung der Osteoblasten und ihre Funktion. Das Produkt des *Cbfa1* Gens, ein osteoblastenspezifischer Transkriptionsaktivator, bindet an ein kritisches osteoblastenspezifisches *Cis*-Element, das im Promotorbereich der murinen Osteocalcingene vorkommt [Ducy et al., 1997; Frendo et al., 1998] und führt so zu einer gesteigerten Transkription des Osteocalcingens. Während der embryonalen Entwicklung schreitet die *Cbfa1* Expression der Osteoblastendifferenzierung voran und ist beschränkt auf mesenchymale Zellen, die zu Osteoblasten oder Chondrozyten transformiert werden [Ducy et al., 1997]. Anschließend ist die *Cbfa1* Expression auf die Osteoblasten limitiert, hypertrophe Chondrozyten zeigen jedoch auch ein niedriges Expressionsniveau [Kim et al., 1999]. Im Embryo erreicht die *Osf2/Cbfa1* Expression an Tag 12,5 p.c. ihren Höhepunkt, noch bevor der erste Ossifikationsherd an Tag 14,5 beobachtet werden kann [Ducy et al., 1997]. *Cbfa1* wird ebenso in Odontoblasten, den Dentin synthetisierenden Zahnhomologen der Osteoblasten, exprimiert, reguliert die Expression des osteoklastischen Differenzierungsfaktors und ist deshalb an der Osteoklastogenese beteiligt [D'Souza et al., 1999; Gao et al., 1998]. Neuere Studien belegen, dass *Cbfa1* auch in die Regulation weiterer Gene eingreift, die in der Osteogenese aktiviert werden, wie etwa alkalische

Phosphatase,  $\alpha 1$  und  $\alpha 2(I)$  Kollagen und Osteopontin, da auch sie Cbfa1 Bindungsstellen in ihren Promoterregionen enthalten [Harada et al., 1999; Kern et al., 2001; Ducy et al., 1997].

Die Mineralisierung der Matrix wird von der Expression des membranständigen Enzyms alkalische Phosphatase (ALP) initiiert. Alkalische Phosphatase ist hauptsächlich in der Zellmembran einer ganzen Bandbreite von Geweben präsent. Man unterscheidet jedoch mehrere Typen, zum einen TNS-ALP (Tissue nonspecific, nicht gewebespezifisch), intestinale ALP und plazentale ALP. Die TNS-ALP ist diejenige, deren Isoenzyme man in Knochen, Leber, Niere und anderen Organen findet [Gosecki-Sone et al., 1999; Weiss et al., 1986]. Das membrangebundene Enzym ist ein eher früh in der Entwicklung exprimierter Marker, denn während der Embryonalentwicklung ist die Expression der alkalischen Phosphatase bereits an Tag 11,5 p.c. nachweisbar [Turksen und Aubin, 1991; Tuckermann et al., 2000]. Dieses Enzym ist in der Zellmembran lokalisiert und scheint nach außen in die kalzifizierende Zellmatrix abgegeben zu werden [Bernard, 1978].

Wie schon erwähnt, besteht Knochengewebe nicht nur aus Zellen, es enthält vielmehr hauptsächlich eine extrazelluläre Matrix, deren wichtigsten Bestandteile Kollagen Typ I, Osteopontin, Osteonectin, Bone Sialoprotein und Osteocalcin von den Osteoblasten in einer zeitlich geordneten Abfolge extrazellulär abgelagert werden.

Das Typ I Kollagen herrscht in den bedeutsamsten konnektiven Geweben vor und repräsentiert das bei weitem prädominanteste Kollagen in Vertebraten. Etwa 85-90% der gesamten organischen Knochenmatrix bestehen aus Kollagen Typ I [Termine und Robey, 1996]. Als ein heterotrimeres Protein besteht es aus zwei  $\alpha 1(I)$  Ketten und einer  $\alpha 2(I)$  Kette und wird deshalb auch als  $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$  Typ bezeichnet [Chu et al., 1983]. Die Heterotrimere werden intrazellulär aus Vorläufern, sogenannten pro-  $\alpha$  Ketten, gebildet [Kivirikko et al., 1984]. Die pro-  $\alpha$  Ketten des Kollagen Typ I unterscheiden sich von ihrem metabolisch aktiven Derivat durch die Existenz additiver Sequenzen sowohl am C- wie auch am N-Terminus, die bei der Prozessierung abgespalten werden. Die langen Gly-X-Y Tripletregionen in  $\alpha 1(I)$  und  $\alpha 2(I)$ , die eine Sequenz von 1014 Aminosäureresten umspannt, und eine Prävalenz von Prolyl- und Hydroxylprolylresten in den X und Y Positionen spezifizieren die tripelhelikale Konformation der Ketten und sind für die Stabilität des Kollagens verantwortlich. Dieselbe Konformation begründet aber auch seine Flexibilität [Miller und Gay, 1987]. Extrazelluläre Aggregate des Kollagens nehmen die Form einer Fibrille oder Faser an, in der die Moleküle lateral assoziieren, aber definierte axiale Verschiebungen aufweisen. Kollagen Typ I bildet das Grundgerüst der Knochenmatrix, in die nicht-kollagenäre Proteine eingeordnet werden, um zur Kalzifizierung zu führen [Sasano et al., 2000]. Besonders den Glycoproteinen werden dabei zwei Rollen in kalzifizierbaren Geweben zugeschrieben. Zum einen agieren sie als strukturelle Komponenten in Assoziation mit Proteoglycanen und stellen Kalzium- und/oder Phosphatbindestellen bereit. Zweitens modulieren sie die Aktivität kalziumabhängiger

Phosphatasen und ATPasen, was auf eine Rolle in der initialen Mineraldeposition hinweist [Davies et al., 1996].

In einer frühen Phase der Knochenentwicklung sekretieren die Osteoblasten Osteopontin, ein phosphoryliertes Glycoprotein. Es wird in mehreren Geweben des gesamten Körpers exprimiert und ist obendrein in mineralisiertem Gewebe reichlich vorhanden [Brown et al., 1992; Butler et al., 1996]. Gemäß seiner allgemeinen Azidität, die von den poly-Asp Sequenzen und einem hohem Grad an Phosphorylierung herrührt, bindet es an kalzifizierte Matrices und vereinigt organische mit anorganischen Phasen, um die Zelladhäsion zu fördern. Wegen dieser Eigenschaften ist Osteopontin an Knochenbildung und -umbau beteiligt [Goldberg et al., 1995; McKee und Nanci, 1996; Termine und Robey, 1996; Denhardt und Guo, 1993]. *In vitro* bindet Osteopontin Hydroxyapatit und hat eine Bindungsaffinität für Kalziumionen [Oldberg et al., 1986; Somerman et al., 1987]. Zusätzlich zu seiner Zellverknüpfungskapazität, hat Osteopontin die Eigenschaften eines Zytokins [Patarca et al., 1993]. Mäuse, denen Osteopontin fehlt, zeichnen sich durch eine normale Knochenentwicklung aus, die Osteoklastenbildung ist jedoch verändert [Rittling et al., 1998].

Das häufigste nicht-kollagene Protein ist das Osteonectin, ein phosphoryliertes, sehr saures und cysteinreiches Glycoprotein, das auf Grund dieser Eigenschaft eine hohe Affinität zur Bindung von ionischem Kalzium und physiologischem Hydroxyapatit aufweist und als Modulator von Zell-Matrix Interaktionen agiert [Termine und Robey, 1996]. Es wird in einer großen Anzahl adulter und embryonaler Gewebe exprimiert, z.B. in sich entwickelndem Knochen, interstitiellen Hodenzellen, Odontoblasten, Deciduum, Zona fasciculata und der Nebenniere [Holland et al., 1987]. Seine genaue Rolle ist noch nicht definiert, *in vitro* Studien lassen aber pleiotrope Effekte des Osteonectin auf die Genexpression vermuten [Lane und Sage, 1994]. Osteonectin induziert die Expression von Metalloproteinasen in Fibroblasten und stimuliert die Angiogenese *in vivo* und *in vitro* [Iruela-Arispe et al., 1995; Lane et al., 1994; Tremble et al., 1993]. Ferner vermag Osteonectin die Aktivitäten von Wachstumsfaktoren und Proteasen innerhalb der Matrix zu lokalisieren, da es Kollagen Typ I bindet [Kelm et al., 1994]. Osteonectin kann selbst den Zellzyklus regulieren; während es in endothelialen Zellen die DNA Synthese herunterreguliert, hat es einen moderaten stimulatorischen Effekt auf die osteoblastische Zellproliferation [Funk und Sage, 1993; Young et al., 1992]. Osteonectin-defiziente Mäuse zeigen einen dramatischen Abbau an Osteoklasten und Osteoblasten, assoziiert mit verminderter Knochenformation [Delany et al., 2000].

Bone Sialoprotein wird ebenfalls von den Osteoblasten synthetisiert und in der Knochenmatrix als hoch glykosiliertes Protein akkumuliert. Es ist ein eher kleines Protein, das stark posttranslational modifiziert wird [Fisher et al., 1983]. Bone Sialoprotein ist durch die Anwesenheit einer Arg-Gly-Asp Sequenz charakterisiert, die an Integrinrezeptoren anderer Zellen bindet und die Zell-Zell Verknüpfung stimuliert [Oldberg et al., 1988a; Oldberg et al., 1988b; Somerman et al., 1988]. Bone

Sialoprotein Expression ist auf die Zellen begrenzt, die eine Typ I Kollagen Matrix synthetisiert haben und deswegen aktiv mineralisieren [Chen J et al., 1992]. Es tritt erst in späteren Stadien der Osteogenese als einer der primären Marker terminal ausdifferenzierter Osteoblasten auf [Bianco et al., 1991].

Osteocalcin ist das einzige osteoblastenspezifische Protein [Hauschka et al., 1989]. Als ein Mitglied der Gla Protein Familie gründet sich sein Name auf die Anwesenheit von  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäureresten, welche mit hoher Affinität Kalzium und andere Mineralionen binden können [Aubin und Liu, 1996; Karsenty 1999]. Der Anteil dieses kleinen Polypeptids (6000 Da) am Gesamtprotein im Knochen beziffert sich auf 1-2%. Die Transkription des Osteocalcins steigt mit der Ausbreitung der Kollagenmatrix und ihrer Kalzifizierung [Poliard et al., 1993]. Eine seiner Aufgaben ist die Rekrutierung von Osteoklasten [Davies, 1996; Glowacki et al, 1991]. Dies geschieht wahrscheinlich auf Grund seiner chemotaktischen Eigenschaften gegenüber mesenchymalen Zellen, Fibroblasten und auch osteoblastenähnlichen Zellen [Lucas et al., 1988]. Seine zweite Aufgabe ist die Inhibierung der Osteoblastenaktivität [Ducy et al., 1996]. Osteocalcin-defiziente Mutanten akkumulieren Knochenmatrix in großem Umfang, die Mineralisierung ist jedoch nicht beeinträchtigt [Wolf, 1996]. Mäuse, denen funktionelles Osteocalcin fehlt, zeigen eine erhöhte Knochendichte, ein Zeichen für die Limitierung der Knochenformation durch Osteocalcin [Ducy et al., 1996]. Osteocalcin gilt also als negativer Regulator der Knochenbildung und wird posttranslational von Vitamin K<sub>2</sub>, einem Kofaktor der  $\gamma$ -Carboxylase, modifiziert, die Konversion eines spezifischen Glutaminsäurerestes zu Carboxyglutaminsäure katalysiert [Esmon et al., 1975].

Mitglieder aller Familien von Wachstumsfaktoren werden mit der Kontrolle der Osteoblastendifferenzierung während der Embryonalentwicklung in Zusammenhang gebracht. Einige knochenmorphogenetische Proteine (BMP, Bone morphogenetic Protein) können als Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie und regulierende Faktoren der mesenchymalen Stammzelldifferenzierung die *Cbfa1* Expression *in vitro* induzieren. Ihre allgemeinen Aufgaben definieren die Organo- und Embryogenese, wie auch die Knochenformation und Frakturheilung [Kingsley, 1994; Hogan, 1996; Sakou, 1998; Wozney und Rosen, 1998]. Diese sekretierten Signalmoleküle agieren als pleiotrope Regulatoren während der Chemotaxis, Mitose und Differenzierung [Sakou, 1998; Reddi, 1994; Wozney et al., 1988]. Als eines am besten definiertes Mitglied der BMP Familie fungiert BMP-2 in der Osteoblastendifferenzierung. Unter BMP-2 Induktion beginnen mesenchymale Vorläuferzellen zu proliferieren und die alkalische Phosphatase Aktivität zu erhöhen.

Der Regulation über Transkription und Wachstumsfaktoren ist die endokrine Kontrolle der Osteoblastenfunktion übergeordnet. Da Knochengewebe das Reservoir von zirka 99% des extrazellulären Kalziums darstellt, beeinflussen Hormone, die den Kalziumhaushalt regulieren, die

Zellfunktion. Das bedeutendste hyperkalzämische Hormon ist das 1,25-OH Vitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>), das sich auf Grund der Förderung der intestinalen Absorption des Kalzium auszeichnet [Dusso and Brown, 1998]. Obwohl die allgemeine Funktion des VD<sub>3</sub> die Knochenresorption ist, sind es die Osteoblasten und nicht die Osteoklasten, die einen nukleären Rezeptor für dieses Hormon tragen. Durch die Bindung des Hormons an seinen Rezeptor kommt es zur Repression der Gene Kollagen Typ I und Bone Sialoprotein und zur Induktion der Gene für Osteopontin und Osteocalcin [Oldberg et al., 1989; Owen et al., 1991; Lichtler et al., 1989]. VD<sub>3</sub> induziert über ein VD<sub>3</sub> Rezeptor respondierendes Element in der Promotorregion des Osteocalcins eine gesteigerte Vitamin K-abhängige  $\gamma$ -Carboxylierung [Morrison et al., 1989]. Die mRNA Synthese des Osteopontin und der natriuretischen Peptide (NP) steigt in MOB Zellen (murinen Osteoblasten) *in vitro* unter VD<sub>3</sub> Einfluss. NPs supprimieren die Zellproliferation und erhöhen das intrazelluläre cGMP, was wiederum die Expression der alkalischen Phosphatase und des Osteocalcins wie auch die Mineralisierung der Zellen induziert [Hagiwara et al., 1996]. Zyklisches AMP scheint eine große Bedeutung für die Differenzierung osteoblastischer Zellen *in vivo* zu haben [Hakeda et al., 1985].

Als weitere Induktoren der Mineralisierung gelten Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerophosphat. Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Ascorbinsäure für die Deposition einer Kollagenmatrix und die Expression eines osteoblastischen Phänotyps *in vivo* unerlässlich ist [Aronow et al., 1990; Franceschi und Iyer, 1992; Gerstenfeld et al., 1987, Owen et al., 1990]. Ascorbinsäure fördert die Osteogenese in MC3T3-E1 Zellen vermittelt von der extrazellulären Akkumulation des Typ I Kollagen [Torii et al., 1994]. Die Ascorbinsäure wird in die Osteoblasten über einen saturierbaren, stereospezifischen, Na<sup>+</sup>-abhängigen Transporter aufgenommen, der Ascorbinsäure intrazellulär 100-fach akkumuliert [Wolf, 1996b]. Als Antwort auf die durch Ascorbinsäure ausgelöste Deposition der Kollagenmatrix wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase gesteigert, ein Marker der Differenzierung prä-osteoblastischer Zellen.

Der zweite Induktor  $\beta$ -Glycerophosphat fördert die Kalzifizierung der von den Osteoblasten produzierten extrazellulären Kollagenmatrix. In Anwesenheit von  $\beta$ -Glycerophosphat erscheint kristallines Hydroxyapatit [Beck et al., 2000] assoziiert mit den von der Ascorbinsäure induzierten abgelagerten Kollagenfibrillen [Kellermann et al., 1990].

#### **1.2.4.2 Knorpel und Chondrogenese**

Wie der Osteoblastendifferenzierung geht auch der Knorpelentwicklung die mesenchymale Kondensation voraus, gefolgt von einer Serie von Chondrozytenreifungsprozessen. Der Reifungsprozess der Chondrozyten kann über die Expression extrazellulärer Matrixgene und über die Änderung der Chondrozytenmorphologie definiert werden. Prächondrogene Zellen exprimieren Typ I Kollagen und die Induktion des Kollagen Typ II geht parallel mit der Änderung des zellulären Phänotyps von prächondrogenen Zellen zu proliferierenden Chondrozyten [Kosher et al., 1986].

Die Expression des Typ X Kollagen ist auf hypertrophe Chondrozyten beschränkt und die Induktion der Typ X mRNA wird als Signal im Übergang des zellulären Phänotyps von proliferierenden zu hypertrophen Chondrozyten angesehen [Gerstenfeld und Landis, 1991]. Die hypertrophen Chondrozyten ihrerseits stellen den Übergang zu Knorpelgewebe dar.

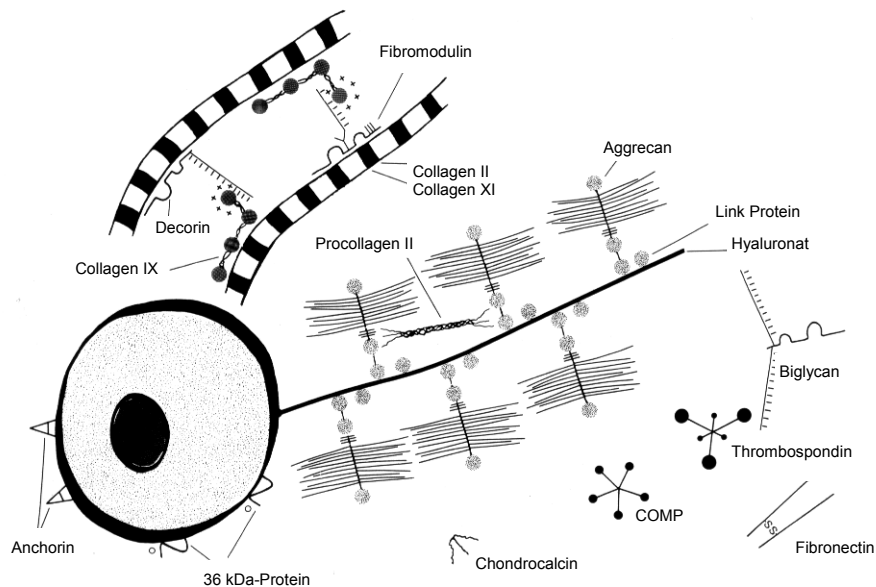


Abb. 2.: Schematische Illustration der Chondrozyte mit der sie umgebenden Knorpelmatrix. Dargestellt sind die Interaktionen der verschiedenen Moleküle. Die kürzeren Seitenketten des Aggrecan repräsentieren Keratansulfat, die längeren Chondroitinsulfat. COMP = Knorpeloligomeres Matrixprotein. Modifiziert nach Heinegard und Pimentel, 1992.

Im Gegensatz zu Knorpelgewebe kommt Knorpel auch im Gewebe von Invertebraten wie Gastropoden vor. Im postnatalen Leben des Säugers ist Knorpel an zwei Stellen lokalisiert. Die erste korrespondiert mit den extraskelettalen knorpeligen Strukturen etwa in der Nase, die zweite ist in den beweglichen Gelenken lokalisiert und wird artikulärer Knorpel genannt. Generell kann Knorpel neuroendodermalen Ursprungs sein oder dem Mesenchym entstammen. Die mechanistischen Eigenschaften des Knorpels basieren auf den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Matrix. Diese Matrix wird ähnlich wie im Knochen von einer eigens dafür vorgesehenen Zelle, der Chondrozyte, synthetisiert und nach außen sezerniert.

Die beiden Hauptbestandteile der Matrix sind Kollagenfibrillen und Aggregate von Proteoglycanen, die auf Grund der polyanionischen Glucosaminoglycanseitenketten einen hohen osmotischen Druck aufbauen, der Wasser in das Gewebe zieht und das Kollagenetzwerk anschwellen lässt. Das Gleichgewicht zwischen osmotischer Schwellung und der Rigidität der Kollagenfibrillen resultiert in der charakteristischen Elastizität dieses Gewebes. Eine Reihe anderer kleiner Proteine sind in das Kollagen-Proteoglycan-Netzwerk integriert (Abb. 2).

Kollagen Typ II [ $\alpha 1(\text{II})_3$ ] ist die dominante Form im Knorpel im Gegensatz zum Typ I der Knochenmatrix. Seine molekularen Dimensionen und seine polymere Form entspricht der des Kollagen Typ I. Im Typ II System reduziert die extrazelluläre Prozessierung der Prokollagenmoleküle das Protein zu Ketten mit einem Molekulargewicht von 95 kDa [Miller and Gay, 1987]. Sein Anteil am Gesamtproteinanteil des Knorpels beträgt 60% [Cheah et al., 1991b]. Das Kollagen Typ II ist das Produkt eines einzelnen Genes, dem *Col2A1*. Alternatives Spleißen der prä-mRNA produziert zwei Isoformen, Typ IIA und Typ IIB Prokollagen [Sandell et al., 1992]. Im adulten Knorpel ist der Typ IIB die prädominante Form [Ryan und Sandell, 1990]. Der Typ IIA dagegen wird während der Entwicklung auch im Herzen, der Epidermis, dem Innenohr und dem Gehirn exprimiert [Cheah et al., 1991]. Mit der Entwicklung und Reifung des Knorpelgewebes steigt der Durchmesser der Kollagen Typ II Fibrillen von weniger als 20 nm auf 50 bis hundert nm oder mehr in adultem humanem artikulären Knorpel [Lane und Weiss, 1975].

Proteoglycane des Knorpel enthalten Chondroitinsulfat und Keratansulfat, sowie O- und N-gebundene Oligosaccharide. Die Anzahl, Größe oder Ladung dieser Komponenten variiert mit der Entwicklung und dem Alter des Organismus. Aggrecan ist mit einem Anteil von 80% die häufigste Proteoglycanspezies im Knorpel [Heinegard und Paulsson, 1984]. Das Protein selbst trägt nur zu 10% seiner molekularen Masse bei, die verbleibenden 90% machen die an das Kernprotein gebundenen Chondroitinsulfat- und Keratansulfatseitenketten aus [Yamada et al., 1991]. Aggrecanmoleküle aggregieren über eine spezifische Bindung mit der Hyaluronsäure, ein Prozess, der sie in der Matrix verankert. Assistiert wird während des Aggregationsvorgangs von einem globulären Link Protein, das sowohl Aggrecan wie auch Hyaluronsäure bindet [Hardingham, 1979]. Dieses Protein besteht aus drei Schleifen, die extensive Homologie mit der Hyaluronatbindungsregion des Aggrecans aufweisen [Neame et al., 1986]. Analyse von Knock-out Mäusen des Link Protein Gens zeigten, dass es eine Rolle spielt bei der Formation der Proteoglycanaggregate und der normalen Organisation hypertropher Chondrozyten [Watanabe und Yamada, 1995].

Zusätzlich zum Aggrecan kommen zwei Mitglieder der Familie der kleinen Proteoglycane, Decorin und Biglycan im Knorpel vor. Decorin, ein Proteoglycan vieler vaskulärer und avaskulärer Bindegewebe, gehört einer wachsenden Familie kleiner leucinreicher Proteoglycane an, die in die extrazelluläre Matrix sekretiert werden. Es besteht aus einem Proteinkern von etwa 36 kDa, substituiert mit einer einzigen Glycosaminoglycankette (GAG) nahe dem Aminoterminal [Krusius und Ruoslahti, 1986]. Sein Name rührt von der Eigenschaft her, Kollagenfibrillen in einem sehr geordneten Muster zu binden [Scott, 1988; Pringle and Dodd, 1990; Simionescu et al., 1989]. Der Proteinkern des Decorins bindet etwa Fibronectin und TGF $\beta_1$  [Schmidt et al., 1991; Yamaguchi et al., 1990]. Die Bindung von Decorin an TGF $\beta_1$  hemmt die mitogene Aktivität dieses Wachstumsfaktors, was wiederum die Decorin Synthese reguliert [Kähäri et al., 1991]. Die Bindung



des Decorins an die Kollagenfibrillenoberfläche hemmt die Fibrillogenese *in vitro* [Vogel et al., 1984]. Deshalb kontrolliert Decorin wahrscheinlich auch die Fibrillogenese *in vivo*, wobei die GAG Seitenketten die interfibrillären Interaktionen vermitteln könnten, indem sie die Zwischenräume der Kollagenfibrillen beeinflussen. Die Relation des zweiten kleinen Proteoglycans, Biglycan, zu fibrillärem Kollagen ist noch nicht eindeutig geklärt, denn es ist im perizellulären Raum lokalisiert und assoziiert im Gegensatz zu Decorin nicht mit den Fibrillen [Bianco et al., 1990].

Es wurde gezeigt, dass ein Mitglied der Sox- Transkriptionsfaktorfamilie, das Sox9, ebenfalls eine große Rolle während der Chondrozytendifferenzierung und der Knorpelformation spielt [Bi et al., 1999]. Während der Embryonalentwicklung der Maus wird Sox9 in allen Knorpelvorläuferzellen und in Knorpelzellen durchweg während der Deposition der knorpelspezifischen Matrix exprimiert [Wright et al., 1997]. Sox9 reguliert die Verstärkeraktivität für das Kollagen Typ II hoch, indem es an eine Erkennungssequenz im ersten Intron des *Col2A1* Gens bindet [Lefebvre et al., 1997]. *In vivo* werden Sox9 und Kollagen Typ II während der Chondrogenese koexprimiert [Zhao et al., 1997]. Die transkriptionale Aktivität des Aggrecangens wird ebenfalls durch Sox9 *in vivo* und *in vitro* gesteigert [Sekiya et al., 2000; Bi et al., 1999].

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, Scleraxis, ein Mitglied der basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktoren, wird in Knorpelzellen, nicht aber in Knochenzellen oder ihren Vorläuferzellen nachgewiesen, ein Zeichen dafür, dass es in die Chondrogenese nicht aber in die Osteogenese involviert ist [Cserjesi et al., 1995]. Scleraxis Transkripte werden während der Embryogenese in den Sklerotomen der Somite und in mesenchymalen Zellen schon ab Tag 9,5 p.c. exprimiert, lange bevor die eigentliche Chondrogenese zwischen 12,5 p.c. und Tag 14,5 p.c. beginnt [Rugh et al., 1990]. Vor der Ausbildung des embryonalen knorpeligen Skeletts, fällt die Scleraxisexpression ab. Sobald Knorpel und Bindegewebe gebildet werden, findet sich die Scleraxisexpression nur in diesem Bereich.

*In vitro* sind ähnlich wie für die Osteogenese exogene Faktoren für die korrekte Ausbildung von spezifischen Zelleigenschaften der Chondrozyten notwendig. So induziert Insulin die Differenzierung von Chondrozyten [Quarto et al., 1992]. Der anabole Effekt des Insulins auf die Hyaluronsäure und Kollagen Typ II Synthese ist schon in den 80er Jahren in Chondrosarcomachondrozyten beobachtet worden [Arville und Mason, 1983; Bembenek et al., 1982]. Insulin unterstützt auch die Ablagerung von Proteoglycanen und erhöht die DNA Synthese [Maor et al., 1993]. Zugabe von Ascorbinsäure induziert die Synthese von Kollagen und ebenso von hochmolekularen Proteoglycanen. Ascorbinsäure wird somit für den Aufbau der extrazellulären Matrix benötigt, hat aber keinen Einfluss auf das einmal abgespielte Differenzierungsprogramm in Richtung der Chondrozyten [Aronow et al., 1990; Torii et al., 1994; Bounelis und Daniel, 1983; Cancedda et al., 1995].

Eine weitere Rolle im Aufbau der extrazellulären Matrix, sowie in der Zellproliferation und der Differenzierung, wird der Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF) zugeschrieben. Besonders  $\text{TGF}\beta_1$  übt wichtige Funktionen während der Säugerentwicklung aus. Während es das Wachstum der meisten Zellen inhibiert, werden dagegen einige mesenchymale Zellen wie Schwannzellen, Osteoblasten und Chondrozyten stimuliert [Roberts und Sporn, 1990]. Drei eng verwandte Isoformen des TGF ( $\text{TGF}\beta_1$ ,  $\text{TGF}\beta_2$  und  $\text{TGF}\beta_3$ ) werden in einem definiertem zeitlichen und räumlichen Muster während der Embryonalentwicklung exprimiert.  $\text{TGF}\beta_1$  wird im Mesenchym, das differenzierende Knorpelzellen umgibt, aber auch im Perichondrium, dem undifferenzierten Mesenchym der Lunge und im Intestinaltrakt exprimiert [Lawler et al., 1994].

Als Mitglied der  $\text{TGF}\beta$  Superfamilie induziert BMP-2, wie vorher erwähnt, die Osteogenese ist aber auch als Induktor der Chondrogenese in verschiedenen Zelltypen bekannt. Simultane Behandlung mit BMP-2 und  $\text{TGF}\beta_1$  resultiert in einer synergistischen Stimulation der Chondrogenese [Chen P et al., 1991].

### **1.3 Aufgabenstellung**

Geburtendefekte treten durch Änderungen der normal ablaufenden Ereignisse während der Entwicklung auf. Deshalb ist ein *in vitro* Testsystem, das Wachstum und Differenzierung beurteilt, bestens dafür geeignet, teratogene Potentiale einer Substanz aufzudecken. Eine winzige Abweichung oder kurzfristige Unterbrechung der Zellreplikation, Zelldifferenzierung, Zellmigration oder Zellinteraktionen kann irreversible Schäden in nahezu jedem Organ hervorrufen. Obwohl eine morphogenetische Entwicklung innerhalb der EBs nicht möglich ist, weil räumlich kontrollierte Signale fehlen, wird die zelluläre Differenzierung jedoch entwicklungsgerecht und zeitabhängig ausgeführt. Daher scheint das ES Differenzierungsmodell geeignet zu sein, Entwicklungsprozesse auf zellulärer Ebene zu analysieren, was eine Voraussetzung für den Nachweis embryotoxischer und teratogener Faktoren ist.

Das Herz ist das erste Organ im Embryo, das anfängt zu arbeiten. Aus diesem Grund galt die abnormale Kardiogenese bisher als ein guter Indikator für das embryotoxische Potential einer Chemikalie. Im Vergleich zu anderen zellulären *in vitro* Embryotoxizitätstests zieht der Embryonale Stammzell Test (EST) zwei wichtige Aspekte pränataler Toxizität in Betracht (a) die Störung der Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten und (b) den Vergleich der Sensitivitätsunterschiede zwischen embryonalen Zellen und ‚adulten‘ Zellen, den Maus Fibroblasten. Die ausdifferenzierten Kardiomyozyten können wegen ihrer rhythmischen kontraktile Aktivität leicht erkannt und mikroskopisch beobachtet werden. Ein Embryoid Body kann ein oder mehrere schlagende Areale enthalten. Die Differenzierung zu Kardiomyozyten unter Einfluss der Testsubstanz wird durch Auszählen von 24 Embryoid Bodies im Lichtmikroskop bestimmt, die mindestens ein schlagendes Areal enthalten, ohne jedoch die Anzahl oder die Größe

des Areal zu beachten. Diese Semiquantifizierung der kontrahierenden Myokardzellen war bisher schwierig zu standardisieren und konnte nur von gut ausgebildetem erfahrenen Personal durchgeführt werden. Um eine automatisierte Prozedur zu etablieren, die die Differenzierung der ES Zellen überwachen kann, und den Test zu verfeinern und eventuell zu verkürzen, sollte der EST deshalb auf die einfach quantifizierbare molekulare Ebene übertragen werden. Die Differenzierung von Kardiomyozyten sollte im Labor etabliert werden es sollten geeignete herzspezifische Markergene nachgewiesen werden. Die Expressionsänderung solcher Markergene unter Substanzeinfluss sollte als Endpunkt für den erweiterten EST dienen.

Der EST in seiner bisherigen Form kann inhibitorische Effekte durch Testchemikalien besonders in kardialen Gewebe nachweisen, Effekte an neuronalen Zellen würden aber nicht bestimmt werden können. Die morphologische Analyse der Herzzelldifferenzierung alleine ist deshalb unzureichend, um embryotoxische Effekte zu bestimmen, denn das Myokard ist nicht das primäre Zielorgan der meisten embryotoxischen Agenzien. ES Zellen können unter geeigneten Kulturbedingungen auch in andere als myokardiale Gewebe differenzieren, weshalb auch andere Differenzierungslinien in den EST inkorporiert werden sollten. Das Augenmerk lag dabei auf der Entwicklung von Protokollen zur Induktion von Nervenzellen, Knochen- und Knorpelgewebe und auf der Identifizierung von Markergenen für diese Organe.

Zahlreiche Protokolle zur Differenzierung von Nervenzellen sind aus der Literatur bekannt. Die einfachste und auch älteste Methode, ist die Induktion über Retinolsäure. Retinolsäure ist ein potenter Differenzierungsinduktor, aber auch selbst ein sehr wirksames Teratogen, weshalb die neuronale Induktion über Retinolsäure als Endpunkt für die Embryotoxizitätstestung nicht wünschenswert ist. Die vergleichende Analyse der neuronalen Differenzierung über Retinolsäure und über Linienselektion [Okabe et al., 1996], sollte mittels Immunhistochemie und Expressionsanalyse neuronaler Gene herausarbeiten, welches Protokoll zur Nutzung des Nervengewebes als Endpunkt im EST besser geeignet ist.

Zur Induktion der Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten sollte der Einfluss von Medienadditiven auf die Expression knochen- bzw. knorpelspezifischer Gene untersucht werden, die in der Literatur für primäre Kulturen oder auch zur Differenzierung der entsprechenden Zelltypen aus mesenchymalen Stammzellen bekannt sind. Die entstandenen Zellen sollten morphologisch, histochemisch und mittels Immunfluoreszenz charakterisiert werden.

Abschließend sollte für sechs ausgewählte Substanzen die Übertragbarkeit des klassischen EST auf die molekulare Ebene gezeigt werden. Die Änderung der Markergenexpression für die verschiedenen Organe unter Einfluss verschiedener Testsubstanzen sollte der klassischen Methode gegenübergestellt werden und die Vorteile des erweiterten EST herausgearbeitet werden.

## 2 **Material**

### 2.1 **Zelllinien**

Balb/c 3T3 Fibroblasten, Klon A31, wurden bei der europäischen Sammlung von Zellkulturen (European Collection of Cell Cultures) beschafft. Embryonale Stammzellen der Linie D3 wurden bei American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, USA) kommerziell erworben.

### 2.2 **Versuchstiere**

Organentnahmen wurden an männlichen 8 Wochen alten Sv129/Ev Mäusen durchgeführt, dem Mäusestamm, aus dem die embryonalen Stammzellen der D3 Linie isoliert wurden. Zur Isolierung von Embryonalgewebe wurden schwangere weibliche Mäuse, 12,5 Tage p.c. , ebenfalls vom Sv129/Ev Stamm verwendet. Die Tiere wurden von M&B, Dänemark bezogen. Die Haltung der Mäuse geschah in den Tierställen des immuntoxikologischen Labors (Bayer AG, Wuppertal). Die Mäuse wurden *ad libitum* mit einer Standarddiät für Nagetiere (Altromin GmbH, Lage) und Wasser gefüttert. Im Rahmen eines Experimentes wurden nur Mäuse einer Geburtswoche verwendet, die vergleichbare Körpergewichte hatten und nach äußerer Befundung ohne gesundheitliche Auffälligkeiten waren. Die Durchführung der Tierversuche erfolgte gemäß den Bestimmungen der Neufassung des deutschen Tierschutzgesetzes (Bundesgesetzblatt, Teil I, 1998).

### 2.3 **Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Medienadditive**

Plastikmaterial für die Zellkultur stammte ohne Ausnahme von der Firma Falcon (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). RNase und DNase freie Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Filtertips und Reaktionsgefäße wurden von Eppendorf (Hamburg) oder Biozym Diagnostics GmbH (Hessisch Oldendorf) bezogen. Die Medienadditive wurden wie folgt gelöst und mit Ausnahme von  $\beta$ -Glycerophosphat und Tetrazyklin, die bei Gebrauch frisch hergestellt wurden, in Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

L- Ascorbinsäure

bFGF

BMP-2

Fibronectin

Stammlösung 5 mg/ml in PBS

R&D Systems, gebrauchsfertig

Stammlösung 10  $\mu\text{g/ml}$  in PBS, 0,1% BSA

Erhalten von Dr. Walter Sebald, Biozentrum der Universität Würzburg

Stammlösung 0,5 mg/ml in PBS

$\beta$ -Glycerophosphat	Stammlösung 1 M in PBS, filtersterilisiert
Insulin	Stammlösung 10 mg/ml in PBS
Progesteron	Stammlösung 100 $\mu$ M in PBS
Putrescin	Stammlösung 100 mM
Tetrazyklin	Stammlösung 50 mg/ml in PBS
TGF $\beta_1$ , human rekombinant	Stammlösung 2 ng/ml in 0,2 $\mu$ m-filtrierten 4 mM HCl, 0,1% BSA
1 $\alpha$ ,25-OH Vitamin D <sub>3</sub>	Stammlösung 50 $\mu$ g/ml in DMSO, Calbiochem, La Jolla, CA, USA

Alle wässrigen Lösungen wurden mit Wasser aus einer Millipore-Q<sub>Plus</sub>-Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Alkoholische Verbindungen wurden in p.A. Qualität bei der Firma Merck (Darmstadt) erworben, alle verwendeten Chemikalien ebenfalls in p.A. Qualität, wenn nicht anders angegeben, bei Sigma-Aldrich, Steinheim.

## 2.4 Kulturmedien

Sämtliche Medien wurden bei der Firma Invitrogen (Gibco), Paisley, Schottland gekauft und mit den entsprechenden Medienadditiven versetzt. Wenn nicht anders angegeben stammten die verwendeten Medienzusätze von der Firma Sigma, Steinheim.

3T3.A31 Medium	DMEM mit Glutamax I 5% FCS (Gr) 5% Kälberserum (Sigma) 50 U/ml Penicillin 50 $\mu$ g/ml Streptomycin
ES-D3 Medium	DMEM (4,5 g/l Glucose) mit Glutamax I 20% FCS (ausgetestete Chargen) 1% nicht-essentielle Aminosäuren (I) 50 U/ml Penicillin 50 $\mu$ g/ml Streptomycin 0,1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 1000 U/ml LIF (G)
ES Differenzierungsmedium ITSFn-Medium	ES Medium ohne Zusatz von LIF DMEM/F-12 (1:1) mit Glutamax I ITS <sup>+</sup> (1:100) (BD) 5 $\mu$ g/ml Fibronectin
Neuronales Differenzierungsmedium 1	DMEM/F-12 (1:1) mit Glutamax I 50 U/ml Penicillin 50 $\mu$ g/ml Streptomycin ITS <sup>+</sup> (1:100) (BD) 100 $\mu$ M Putrescin 20 nM Progesteron 1 $\mu$ g/ml Laminin 5 ng/ml bFGF (R&D)
Neuronales Differenzierungsmedium 2	DMEM/F-12 (1:1) mit Glutamax I 50 U/ml Penicillin 50 $\mu$ g/ml Streptomycin ITS <sup>+</sup> (1:100) (BD) 100 $\mu$ M Putrescin 20 nM Progesteron 1 $\mu$ g/ml Laminin

3T3.A31 Einfriermedium	DMEM mit Glutamax I 20% FCS (Gr) 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 10% DMSO
ES-D3 Einfriermedium	DMEM (4,5 g/l Glucose) 40% FCS 1% nicht-essentielle Aminosäuren (I) 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 0,1 mM β-Mercaptoethanol 10% DMSO

BD=Becton Dickinson, Gr=Greiner, Frickenhausen, Deutschland, I= Invitrogen, R&D=R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Sämtliche verwendeten Seren wurden vor dem Gebrauch für 30 min bei 56°C inaktiviert. Das ES Medium wurde ohne LIF hergestellt, was erst direkt beim Passagieren der Zellen in die Zellkulturflaschen gegeben wurde. Die fertigen Kulturmedien wurden bei 4°C aufbewahrt und nicht länger als eine Woche benutzt. Direkt vor der Verwendung wurden alle Medien auf 37°C temperiert.

## 2.5 Puffer und Lösungen

Wenn nicht ausdrücklich angegeben, wurden alle Lösungen und in ihnen enthaltene gelöste Chemikalien bei der Firma Sigma erworben.

DEPC-Wasser	Millipore Wasser + 0,1% (v/v) DEPC über Nacht bei RT inkubieren. Vor Gebrauch bei 121°C 60 min autoklavieren.
DMMB-Reagenz	5 ml 3,2% (w/v) Dimethylmethylen Blau (A) in Ethanol + 2 g Natriumformat + 2 ml Ameisensäure (90% w/v) ad 1l Aqua dest., pH 3,5
Proteoglycanextraktionspuffer	4M Guanidin-HCl (ICN)/0,05 M Natriumazetat, pH 5,8 + 100 mM 6-Amino-Kapronsäure + 10 mM EDTA (B) + 5 mM Benzamidin/HCl + 10 mM N-Ethylmaleimid + 0,4 mM Pepstatin + 1 mM PMSF + 1 µg/ml Sojabohnen Trypsin Inhibitor (B)
10x TAE Puffer	400 mM Tris-Azetat 10 mM EDTA, pH 8,0 (I)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA, pH 8,0

A= Aldrich, Steinheim, B = Boehringer, Mannheim, I= Invitrogen

## 2.6 Testsubstanzen

Die Testchemikalien mit bekanntem embryotoxischen *in vivo* Potential wurden aus einer Liste entnommen, die von der amerikanischen Gesellschaft für Teratologie für die Validierung von Embryotoxizitätstests herausgegeben wurde [Smith et al., 1983]. Alle Testchemikalien wurden bei Sigma-Aldrich Chemie (GmbH, Steinheim, Deutschland) gekauft. Alle Substanzen wurden entweder in PBS oder in DMSO gelöst.

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Erster Antikörper

Alle ersten Antikörper stammten, wenn nicht anders angemerkt, von der Firma Chemicon, Temecula, CA, USA und wurden in den entsprechenden Verdünnungen eingesetzt. Der Anti-Osteocalcin Antikörper stammte von der Firma Biotrend, Köln, Deutschland.

	Spezifität	Verdünnung	Isotyp	
Monoklonal	Anti-Mensch Osteopontin	1:100	Ratte IgG <sub>1</sub>	MAB 3057
Polyklonal	Anti-Mensch Osteonectin	1:20	Kaninchen IgG <sub>1</sub>	AB 1858
Polyklonal	Anti-Mensch Bone Sialoprotein	1:100	Kaninchen IgG <sub>1</sub>	AB 1854
Polyklonal	Anti-Maus Osteocalcin	1:100	Ziege IgG <sub>1</sub>	Biotrend 7060-1815
Monoklonal	Anti-Mensch Knorpelproteoglycan (adult)	1:100	Maus IgG <sub>1</sub>	MAB 2015
Monoklonal	Anti-Huhn Kollagen Typ II	1:250	Maus IgG <sub>1</sub>	MAB 8887
Monoklonal	$\alpha/\beta$ -Rind MHC	1:300	Maus IgG <sub>1</sub>	MAB 1546
Monoklonal	Anti-sarkomerisches $\alpha$ -Aktinin	1:200	Maus IgG <sub>1</sub>	Sigma A-7811, Klon EA53
Monoklonal	Anti-Schwein GFAP	1:100	Maus IgG <sub>1</sub>	MAB360
Monoklonal	Anti-Schwein NF 68 kD	1:50	Maus IgG <sub>1</sub>	Sigma N5139, Klon NR4
Monoklonal	Anti-Maus NF 160 kD	1:100	Maus IgG <sub>1</sub>	MAB 5254, Klon NN18
Monoklonal	Anti-Rind NF 200 kD	1:100	Kaninchen IgG <sub>1</sub>	Sigma N4142
Monoklonal	Anti-Rind Synaptophysin	1:100	Maus IgG <sub>1</sub>	MAB5258-50 $\mu$ g, Klon SY38
Monoklonal	Anti-Rind MAP-2	1:100	Maus IgG <sub>1</sub>	MAB 3418, Klon AP-2
Monoklonal	Anti- Myelin	1:100	Maus IgG <sub>1</sub>	MAB 328
Monoklonal	Anti-Ratte NSE	1:10	Maus IgG <sub>1</sub>	MAB 314, Klon F3-1C4

### 2.7.2 Zweiter Antikörper

Alexa Fluor konjugierte Antikörper wurden bei Molecular Probes (Leiden, Niederlande) erstanden. Der Anti-Maus IgG Antikörper stammte von Pierce, Rockford, IL, USA.

Der Alexa Fluor 350 konjugierte Antikörper zeigte sein Absorptionsmaximum bei 346 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 442 nm, für Alexa Fluor 488 lagen die entsprechenden Werte bei 495 und 519 nm und für Alexa Fluor 546 bei 556 und 573 nm. Die Fluoresceinkonjugate konnten entsprechend ihrer grünen Fluoreszenz mit einer Anregungswellenlänge von 450 nm und einer Emissionswellenlänge von 490 nm sichtbar gemacht werden.

Spezifität	Konjugat	Verdünnung	Isotyp	
Anti-Ratte	Alexa Fluor™ 488	1:200	Ziege IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Molecular Probes, A-11006
Anti-Kaninchen	Alexa Fluor™ 546	1:200	Ziege IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Molecular Probes, A-11071
Anti-Kaninchen	Alexa Fluor™ 350	1:200	Ziege IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Molecular Probes, A-11096
Anti-Ziege	Fluorescein	1:100	Huhn IgG (H+L)	Chemicon, AP163F
Anti-Maus	Fluorescein	1:100	Ziege IgG, F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Pierce, 31543

## 2.8 Oligonukleotide

Die Sequenzen der zu untersuchenden Gene wurden aus einer Internet Datenbank gewonnen ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Nucleotide), Genbank) und neue Oligonukleotidsequenzen mit dem Programm Primer Express generiert (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Sequenzvergleiche auf Basis des BLAST Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) nach Altschul et al. (1990, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) verifizierten ihre Spezifität.

Organ	Gen	Orientierung	Basensequenz 5'→3'	Länge des Amplicons	T <sub>a</sub> in °C
Herz	α-MHC	Sense	GAGCTCACCTACCAGACAGAGGA	80 bp	59
		Antisense	CACCTTCAACTGTAGCTTGCCAC		
	β-MHC	Sense	CGAGTCCCAGGTCAACAAGC	82 bp	62
		Antisense	GGGCAGCTCAAGGTCTACTCC		
	α/β- MHC	Sense	ACCTGTCCAAGTTCCGCAAG	82 bp	62
		Antisense	CTTGTTGACCTGGGACTCGG		
Nerven	NFL	Sense	AGTGGCTTTCTGGCTTGCTG	81 bp	59
		Antisense	TCTGTGTGATTACATTGCCATAG		
	NFM	Sense	GCTTTCCTGCGCGTAATC	83 bp	62
		Antisense	TTGCGCTCTACCGTGATGTG		
	NFH	Sense	TGGACATTGAGATTGCCGC	81 bp	60
		Antisense	GAGAGAAGGGACTCGGACCAA		
	MAP-2	Sense	GGTGGAAGGTCTGCAATAGAACA	84 bp	57
		Antisense	GTAAACCCAAGGGCAATGGA		
	Synaptophysin	Sense	AGATGGCCACTGACCCAGAG	81 bp	59
		Antisense	CCCTCAGTTCCTTGCACTGTGT		
	GFAP	Sense	GGGCGAGCGAGCGTG	81 bp	61
		Antisense	GCTGTTCCAGGAAGCGGAC		
	O4	Sense	GGGTCCCCGATCGCTTC	81 bp	60
		Antisense	CAAGGTCTTCAGCCTGCACA		
	Sox2	Sense	GGCTGAACCAGCGCATG	81 bp	62
		Antisense	CCAGCTGCTCCTGCATCAT		
Knochen	Bone	Sense	CAGAGGAGGCAAGCGTCACT	80 bp	62
		Antisense	CTGTCTGGGTGCCAAGCACTG		
	Osteocalcin	Sense	CCGGGAGCAGTGTGAGCTTA	80 bp	60
		Antisense	TAGATGCGTTTGTAGCGGTC		
	Cbfa1	Sense	CCGAGTCATTTAAGGCTGCAA	101 bp	58
		Antisense	TGCGCTGAAGAGGCTGTTT		
	ALP	Sense	GTGCCCTGACTGAGGCTGTC	81 bp	60
		Antisense	GGATCATCGTGTCTGCTCAC		
	Kollagen Typ I	Sense	GCATGGCCAAGAAGACATCC	83 bp	60
		Antisense	CCTCGGGTTTCCACGTCTC		
	Osteopontin	Sense	GATGCCACAGATGAGGACCTC	81 bp	60
		Antisense	CTGGGCAACAGGGATGACAT		
	Osteonectin	Sense	ATCCAGAGCTGTGGCACACA	80 bp	61
		Antisense	GGAAAGAAACGCCGAAGA		
Knorpel	Aggrecan	Sense	GATCTGGCATGAGAGAGGCG	81 bp	61



Kollagen Typ II	Antisense	GCCACGGTGCCCTTTTAC		
	Sense	GCTGCTGACGCTGCTCATC		60
Link Protein	Antisense	GGTTCTCCTTTCTGCCCTT		
	Typ IIA Sonde	CGAGATCCCCTTCGGAGAGTGCTGT	295 bp	
	Typ IIB Sonde	CCAGGATGCCCGAAAATTAGGGCCAA	87 bp	
	Sense	TTCTGGGCTATGACCGCTG	80 bp	60
Biglycan	Antisense	AGCGCCTTCTTGGTCGAGA		
	Sense	CATGACAACCGTATCCGCAA	80 bp	60
Decorin	Antisense	ATTCCCGCCCATCTCAATG		
	Sense	ATGACCCTGACAATCCCCTG	80 bp	60
Scleraxis	Antisense	CCCAGATCAGAACACTGCACC		
	Sense	GGACCGCAAGCTCTCCAAG	82 bp	62
Sox9	Antisense	ACCCACCAGCAGCACATTG		
	Sense	GCAGACCAGTACCCGCATCT	81 bp	62
Allgemein	Antisense	CTCGCTCTCGTTCAGCAGC		
	Oct4	GCCTTGCAAGCTCAGCCTTAA	81 bp	61
	Antisense	CTCATTGTTGTCTGGCTTCCTC		
	GAPDH	GCACAGTCAAGGCCGAGAAT	151 bp	60
	Antisense	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA		

Die lyophilisiert gelieferten Oligonukleotide wurden in TE-Puffer aufgenommen und auf eine Stammkonzentration von 100 pmol/µl gebracht.

## **3 Methoden**

### **3.1 Präparation des Gewebematerials**

Sv129/Ev Mäuse wurden zur Organentnahme in einem speziellen Gefäß durch CO<sub>2</sub> Inhalation abgetötet. Während der Präparation wurden die Organe immer wieder mit PBS bedeckt, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern.

Zum Beginn der Präparation wurde die Haut von der Körpermitte ausgehend durch einen medianen Schnitt nach vorn bis zum Unterkieferwinkel und nach hinten seitlich bis zum Ende des Scrotums aufgeschnitten. Am Kopf wurde das Fell bis zu den Augen und Ohren abgelöst, an den Extremitäten bis zur Mitte von Unterarm und Unterschenkel. Die Abdominalhöhle wurde mit einem Medianschnitt längs der Linea alba nach cranial bis zum Hinterrand des Sternums und caudal bis zur Schambeinsymphyse eröffnet. Ohne den Brustraum zu eröffnen, wurde die Bauchdecke entlang des Rippenbogens entfernt. Fettgewebe, Leber und Niere wurden abgetrennt, entsprechend zerkleinert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Sternum wurde ebenfalls abgetrennt und auf die gleiche Weise eingefroren.

Dann wurde die Brusthöhle eröffnet, indem das Zwerchfell am Rippenbogen entlang aufgetrennt wurde und die Rippen rechts und links vom Brustbein durchtrennt wurden. Herz und Lunge wurden entnommen und eingefroren. Zur Präparation des Gehirns wurde der Kopf zwischen den Condylen des Hinterhauptes und dem Atlas vom Rumpf abgelöst. Die Schädelkapsel wurde von Haut und Muskulatur befreit und vom Hinterhauptsloch ausgehend jederseits über das Auge hinweg durchtrennt. Mit einem vorderen Transversalschnitt wurden die beiden Schnitte verbunden, so dass das Schädeldach abgehoben werden konnte. Das Gehirn wurde entnommen und ebenfalls in flüssigem Stickstoff aufgenommen.

Knochen-, Muskel- und weiteres Knorpelgewebe entstammten dem Oberschenkel. Zu ihrer Präparation wurden die Oberschenkel vorsichtig vom Becken abgetrennt. Der Knorpel des Hüftgelenks wurde mit der Spitze des Skalpells abgesprengt. Knochen- und Muskelgewebe wurden sorgsam voneinander getrennt. Knorpel, Muskel und der mittlere Teil des Oberschenkelknochens wurden eingefroren.

Weiblichen Mäusen wurden zur Entnahme der Embryonen der Bauchraum wie beschrieben eröffnet. Der Uterus duplex mit den perlschnurartig aneinandergereihten Embryonen wurde abgetrennt und die Embryonen vom Uterusmaterial befreit. Einzelne Embryonen wurden durch Dekapitierung abgetötet und ebenfalls sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Isolation der Nukleinsäuren wurde das gesamte Organmaterial bei –80°C gelagert.

## **3.2 Zellkultur**

### **3.2.1 Passagieren der Zellen**

ES-D3 und 3T3.A31 Zellen wurden routinemäßig in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% kultiviert. Erreichten die Zellen ungefähr 80% Konfluität wurden sie durch Trypsinierung auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Dazu wurden die Zellen vom alten Medium durch Dekantieren befreit. Die Kulturen wurden zweimal mit PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen und mit vorgewärmter 0,25%iger Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet. Nach 2minütiger Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen gesammelt und vorsichtig durch Resuspendieren in eine Einzelzellsuspension überführt. Nach Zentrifugation in einer GP-KR Zentrifuge (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA) für 5 min bei 1000 Upm wurde das Zellpellet und in neuem Medium aufgenommen. Die genannten Zentrifugationsbedingungen galten für alle Zentrifugierschritte im Zusammenhang mit der Zellkultur. Nachdem die Zellen erneut gut resuspendiert wurden, wurden sie nach Bestimmung der Zellzahl entweder in einen Differenzierungsversuch eingesetzt oder subkultiviert. Die ES-D3 Zellen wurden in einer Zelldichte von 1x10<sup>6</sup> Zellen/Zellkulturflasche passagiert, die 3T3.A31 Zellen in einer Dichte von 7,5x10<sup>5</sup> Zellen/Zellkulturflasche.

### **3.2.2 Bestimmung der Zellzahl**

Ein Aliquot der Einzelzellsuspension von 10 µl wurde mit CASY®ton (Schärfe System GmbH, Reutlingen) 1:1000 verdünnt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einem CASY®1 Cell Counter+Analyser System, Modell TTC (Schärfe System) über ein kapillares Meßsystem.

### **3.2.3 Kryokonservierung der Zellen**

Die 3T3.A31 und die ES-D<sub>3</sub> Zellen wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Bei Bedarf wurden die Zellen so schnell wie möglich in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in dem 10fachen Volumen ES Medium oder 3T3.A31 Medium aufgenommen. Um das DMSO zu entfernen, wurden die Zellen bei 1000 Upm in einer Beckmann GP-KR Zentrifuge pelletiert (5 min) und in neuem Medium aufgenommen. In einer Dichte von 1x10<sup>6</sup> (ES Zellen) und 7,5x10<sup>5</sup> (3T3 Zellen) wurden die Zellen auf die Zellkulturflaschen verteilt, das LIF wurde direkt zu den ES Zellen gegeben. Die Zellen wurden 25 Passagen nach dem Auftauen nicht weiter verwendet.

Zur Herstellung der Zellvorräte wurden trypsinierte Zellen (3.2.1.) in einer Konzentration von 5x10<sup>6</sup> in Einfriermedium (2.4.) aufgenommen, erst bei -20°C und dann bei -80°C eingefroren und zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff transferiert.

### 3.2.4 Differenzierung der ES Zellen zu Kardiomyozyten, Osteoblasten und Chondrozyten in hängenden Tropfen (Rudnicki und McBurney, 1987)

Die Methode zur Kultivierung der ES Zellen wurde von Heuer et al. (1993) übernommen und modifiziert (zur Nieden et al., 2001). Nach Entzug des LIF bilden ES Zellen spontan Zellaggregate aus, die sich aber in ihrer Größe unterscheiden. Aus diesem Grund wurde ein Kultursystem angewandt, in dem eine definierte Anzahl von Zellen in hängenden Tropfen aggregiert. Die entstehenden Embryoid Bodies (EBs) haben demnach die gleiche Größe.

Die ES Zellen wurden nach 3.2.1. trypsiniert und eine Einzelzellsuspension in Differenzierungsmedium (ES Medium ohne LIF) hergestellt. Je 20 µl der Stammzellsuspension wurden auf die innere Seite des Deckels einer Petrischale, die PBS enthielt, getropft (Abb. 3). Nach Transfer des Deckels in seine richtige Position, wurden die Schalen bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre inkubiert. Die Zellsuspensionen hatten eine Dichte von  $3,75 \times 10^4$  Zellen/ml zur Differenzierung von Kardiomyozyten und Osteoblasten, was 750 Zellen/ Tropfen entspricht, und  $4 \times 10^4$  Zellen/ml zur Differenzierung von Chondrozyten (800 Zellen/ Tropfen).

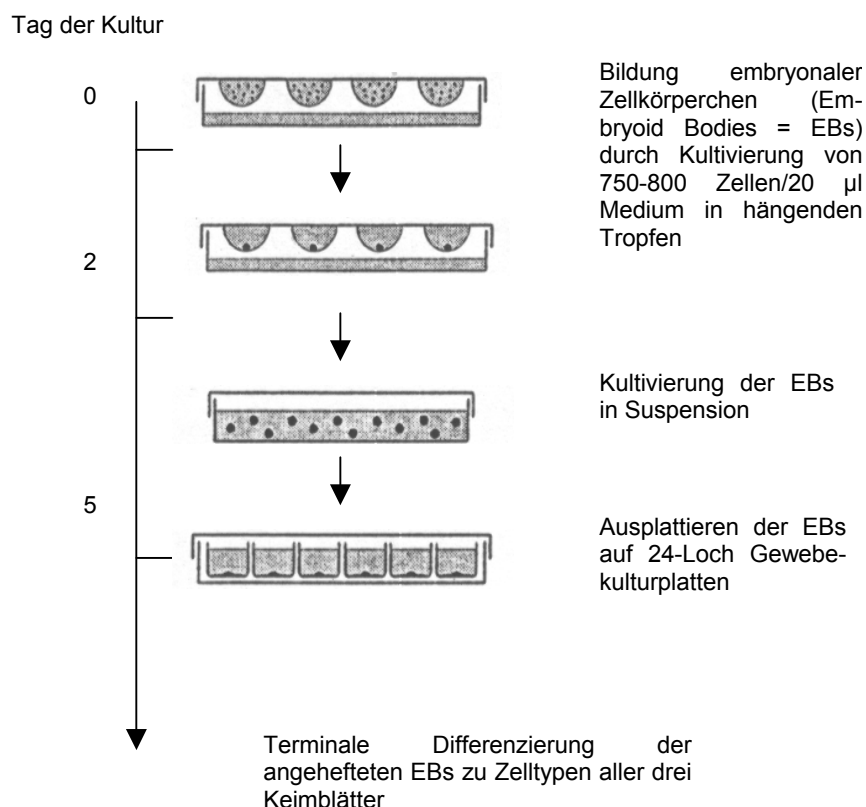


Abb. 3.: Schematische Darstellung des Differenzierungsprotokolls der embryonalen Stammzellen. Über die ‚hängende Tropfen‘ Kultur werden ES Zellen unter Entzug des Einflusses von LIF zur Differenzierung induziert.

Am dritten Tag der Kultur wurden die Zellaggregate (Embryoid Bodies = EBs), die sich am unteren Ende der hängenden Tropfen gebildet hatten, auf bakteriologische Schalen aufgebracht, an denen die Zellen sich nicht anheften konnten (Suspensionskultur).

Nach zwei weiteren Tagen wurden die EBs vereinzelt auf 24-Loch Gewebekulturplatten aufgebracht, wo sie sich anhefteten und terminal differenzierten. Ab Tag 10 der Kultur wurde das Medium alle zwei Tage erneuert. Zur Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten enthielt das ES Differenzierungsmedium die entsprechenden Zusätze (siehe Ergebnisteil).

### **3.2.5 Differenzierung der ES Zellen zu Nervenzellen**

#### **3.2.5.1 Retinolsäure**

Zur Induktion neuronaler Zellen mit Retinolsäure wurden die Zellen nach 3.2.4. kultiviert, jedoch während der ersten drei Tage oder während der Suspensionskultur mit verschiedenen Retinolsäurekonzentrationen behandelt (siehe Ergebnisteil).

#### **3.2.5.2 Linienselektion**

Die Differenzierung neuronaler Zellen über Linienselektion geschah in vier Phasen. In Phase I wurden je 800 Zellen in hängenden Tropfen wie unter 3.2.4. beschrieben aggregiert. An Tag 3 wurden die entstandenen EBs in die Suspensionskultur überführt. Im Gegensatz zu den anderen Differenzierungsprotokollen wurden die EBs erst an Tag 6 beim Übergang in Phase II auf die 24-Loch Gewebekulturplatten transferiert. Dort wurden sie in ITSFn Medium aufgenommen. Nach einwöchiger Kultur wurden die EBs an Tag 14 der Kultur mit 0,05% Trypsin/ 0,04% EDTA-Lösung dissoziiert, resuspendiert und pelletiert. Die Zellen wurden in DMEM/10% FCS aufgenommen und die Zellzahl nach 3.2.2. bestimmt. Die Zellsuspension wurde für Phase III auf  $2 \times 10^5$  Zellen/ml mit neuronalem Differenzierungsmedium 1 eingestellt und je 1 ml pro Plattenvertiefung auf poly-L-Ornithin, 1 µg/ml Laminin beschichtete 24-Loch Gewebekulturplatten verteilt. Nach einer weiteren Kulturwoche an Tag 21 der Kultur wurde das neuronale Differenzierungsmedium 1 durch neuronales Differenzierungsmedium 2 ausgetauscht (Phase IV). Während der gesamten Kulturdauer wurde das Medium jeden zweiten Tag erneuert.

### **3.3 Der embryonale Stammzelltest**

#### **3.3.1 Differenzierungstest**

Zur Testung der Differenzierungsinhibition durch Testchemikalien wurden die ES Zellen während der Differenzierung von Tag 1 an über die gesamte Kulturdauer mit den entsprechenden Testsubstanzen versetzt. Für jede Testkonzentration wurde eine 24-Loch Zellkulturplatte verwendet. Die Differenzierung wurde an Tag 10 durch mikroskopische Auswertung der EBs beurteilt. Der Prozentsatz der Plattenvertiefungen jeder Platte, in denen sich kontrahierendes Myokard gebildet hatte, wurde bestimmt und mit dem Prozentsatz verglichen, der für die Lösungsmittelkontrolle gefunden wurde. Hier galt ein Experiment nur dann als auswertbar, wenn in den Kontrollen mindestens 21 von 24 Plattenvertiefungen EBs mit kontrahierenden Arealen enthielten. Die Inhibition der Differenzierung ausgewertet über die Kontraktion der Kardiomyozyten ( $ID_{50}K$ ) wurde als die Konzentration der Testchemikalie ausgedrückt, die eine Entwicklung in kontrahierendes Myokard gegenüber der Kontrolle um 50% minderte. Sie konnte der ermittelten Konzentrations-Wirkungskurve entnommen werden.

Für die neu entwickelten Endpunkte wurden die Zellen entsprechend den anderen Differenzierungsprotokollen kultiviert, das Medium enthielt jedoch immer ab Tag 1 die entsprechende Konzentration der Testchemikalie. Bei Wechsel des Mediums enthielt es ebenfalls die Testsubstanz in der zu untersuchenden Konzentration.

#### **3.3.2 MTT-Test**

500 Zellen/200  $\mu$ l D3 oder 3T3 Zellen wurden in jede Vertiefung einer 96-Loch Zellkulturplatte gesät und in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Testsubstanzen für 10 Tage in Kultur gehalten. Eine Kontrolle, die nur Lösungsmittel enthielt, wurde ebenfalls einbezogen. Testsubstanz und Kontrolle wurden in sechs unabhängigen Experimenten getestet. Das Medium wurde an den Tagen 3 und 5 der Kultur erneuert und enthielt immer auch die entsprechende Konzentration der Testchemikalie. An Tag 10 wurde die Viabilität der Zellen über den MTT-Test ermittelt. Dieser beruht auf der Kapazität mitochondrialer Dehydrogenasen, welche nur in lebenden Zellen vorkommen, das gelbe MTT Substrat (5 mg/ml) in einer 2stündigen Inkubationsphase in ein dunkelblaues Formazanprodukt zu konvertieren. Die Absorption des Formazans wurde in einem Spektrophotometer (Spectra Fluor Plus, Tecan, Österreich) bei 570/630 nm gemessen. Die Zytotoxizität der Testsubstanz wurde als die Konzentration angegeben, die das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle um 50% reduziert ( $IC_{50}$ ) und aus einer Dosis-Wirkungskurve ermittelt wurde.

### **3.4 Isolation, Quantifizierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren**

#### **3.4.1 RNA-Isolation**

20 EBs pro Probe wurden mit 0,25%iger Collagenase in PBS, 20% FCS durch 20 minütige Inkubation bei 37°C nach einem Protokoll von Keller et al. (1993) von der Zellkulturplatte abgelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 1000 Upm, Beckmann Coulter GP-KR), in Guanidium-Isothiocyanat-haltigem Lysepuffer aufgenommen (Qiagen, Hilden, Deutschland) und bis zur weiteren Verarbeitung bei –80°C aufbewahrt. Die verschiedenen Gewebe der Mäuse wurden nach ihrer Entnahme ebenfalls in Lysepuffer aufgenommen und in einer Schüttelmühle zerkleinert. Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation in einer 5415C-Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) entfernt. Der die RNA enthaltene Überstand wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei –80°C eingelagert.

Zur RNA-Isolation (Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure) mit dem RNeasy Midi Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers wurden die Proben langsam aufgetaut und über eine 21G Kanüle (Terumo, Leuven, Belgien) die enthaltenen Nukleinsäuren geschert. Die Proben wurden zur Dehydratisierung der RNA mit dem gleichen Volumen an 70%igem Ethanol (v/v) äquilibriert. Die Isolation erfolgte durch Adsorption der totalen RNA an eine hydratisierte Silicagelmembran in einer speziellen Zentrifugationssäule (RNeasy Spin Column, Qiagen). Kontaminationen wurden durch 3 Waschschrte mit den entsprechenden Puffern des Herstellers und Zentrifugation (5 min, 3000g) eliminiert. Die adsorbierte Gesamt-RNA wurde in 2x 100 µl DEPC-Wasser rehydratiert und eluiert.

#### **3.4.2 Isolation von genomischer DNA**

Genomische DNA wurde aus dem Oberschenkelmuskel der Sv129 Mäuse mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Etwa 25 mg Gewebe wurde kleingeschnitten und mit dem mitgelieferten Lysepuffer versetzt. Proteinase K (Invitrogen) wurde der Reaktion zugesetzt, um das Gewebe innerhalb von 3h bei 55°C vollständig zu lysieren. RNase A [2 µg/ml] wurde zum Reaktionsansatz gegeben und für 2 min bei RT inkubiert. Das Äquivalenzvolumen des gesamten Ansatzes wurde an Puffer AL (Qiagen) addiert und das Reaktionsgemisch für 10 min bei 70°C inkubiert. Ein Äquivalenzvolumen 100% Ethanol wurde zur Äquilibrierung der DNA hinzugegeben, bevor die DNA an die spezielle Silicamembran der Qiagensäule adsorbieren konnte. Drei Waschschrte mit mitgelieferten Puffern entfernten Proteine und andere Verunreinigungen der DNA durch Zentrifugation (1 min, ≥ 6000g). Die gereinigte DNA wurde 200 µl eines mitgelieferten Eluierungspuffer von der Säule gewaschen.

### **3.4.3 Quantifizierung von RNA**

Die Menge der isolierten totalen RNA wurde mit dem RNA RiboGreen™ Quantifizierungsreagenz und Kit bestimmt (Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Aliquots jedes Isolationsansatzes wurden 1:800 verdünnt und in einer 96-Lochzellkulturplatte im Verhältnis 1:1 mit 100 µl des verdünnten RiboGreen Reagenzes (1:200) versetzt. Sowohl RNA wie auch RiboGreen Reagenz wurden in 1xTris-EDTA-Puffer (Molecular Probes) verdünnt. Bei jeder Messung wurde ein ribosomaler RNA Standard (Molecular Probes) in einer seriell verdünnten Konzentrationsreihe mitgeführt. Der RiboGreen™ Farbstoff lagerte sich in ssDNA ein, so dass seine Fluoreszenzemission in einem CytoFluor II Fluorescence Multi-Well-Plate Reader (PerSeptive Biosystems, Freiburg) gemessen werden konnte. Die Anregungswellenlänge betrug 480 nm, die Emissionswellenlänge 520 nm. Die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte mit der CytoCalc Software, Version 3.2, PerSeptive Biosystems.

Die Qualität der RNA wurde über die Ratio der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt, die vorher in einem DU-70 Spektrophotometer (Beckmann Instruments, München) bestimmt worden waren. Es wurden nur Isolationsansätze verwendet, deren Absorptionskoeffizient  $\geq 1,6$  betrug.

### **3.4.4 Quantifizierung von genomischer DNA**

Die Menge der isolierten genomischen DNA wurde mit dem PicoGreen® dsDNA Quantifizierungsreagenz und Kit bestimmt (Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Diese Methode beruht, wie die Quantifizierung über RiboGreen, darauf, dass sich ein Farbstoff in die Nukleinsäure einlagert, der erst nach erfolgter Bindung fluoresziert. Der PicoGreen® Farbstoff lagerte sich nur in dsDNA ein. Aliquots des Isolationsansatzes der genomische DNA wurden 1:100, 1:200 bzw. 1:500 verdünnt mit dem äquivalenten Volumen des 1:200 verdünnten PicoGreen® Reagenzes versetzt. Wie auch zur Quantifizierung von RNA wurden die Proben und das Reagenz in 1xTris-EDTA-Puffer (Molecular Probes) verdünnt. Als Standard wurde seriell verdünnte Lambda DNA (Molecular Probes) benutzt. Die Fluoreszenz konnte im gleichen Gerät mit den selben Filtern detektiert und über die selbe Software ausgewertet werden, welche für die RNA Konzentrationsbestimmung benutzt wurden.

### **3.4.5 Reverse Transkription**

Komplementäre DNA wurde von 550 ng RNA pro Reaktionsansatz mit 15 U Superscript II RNase H<sup>-</sup> reverser Transkriptase synthetisiert. Die Erststrangreaktion enthielt außerdem 50 ng Random Hexamere, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT und 0,5 mM dNTPs in Erststrangpuffer (alles Invitrogen, Karlsruhe) in einem totalen Reaktionsvolumen von 50 µl. Die Reaktion wurde für 15 min bei 25°C aktiviert, die Elongation der Stränge erfolgte bei 42°C für 50 min und die Synthese wurde bei 70°C



für 15 min terminiert. Kontaminationen mit verbliebener RNA wurden durch 20 minütige Inkubation bei 37°C mit 2 U RNase H (Invitrogen) eliminiert.

#### **3.4.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Mullis und Faloona, 1987)**

Die cDNA wurde im weiteren Verlauf der Experimente mittels PCR vervielfältigt. PCR Reaktionen enthielten 5 µl der Erststrangreaktion, jeweils 0,8 µM des sense und antisense Oligonukleotids, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs und 2.5U Taq DNA Polymerase in PCR Puffer (Invitrogen).

Die Reaktionsansätze wurden einer Zwei-Schritt PCR mit den folgenden Zyklusbedingungen unterzogen: 40 Zyklen Denaturierung bei 94°C für 30 s und Annealing und Elongation für 30 s bei der entsprechenden Annealingtemperatur des verwendeten Oligonukleotidpaares (2.8.).

Die amplifizierten Produkte wurden auf 3%igen Agarosegelen in TAE-Puffer (Invitrogen) elektrophoretisch getrennt und durch Färbung der Gele mit Ethidiumbromid [5 µg/ml in TAE-Puffer] unter UV Licht sichtbar gemacht. Fotografien entstanden mit einem Imager System der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland).

Erststrangsynthese wie auch PCR Reaktionen fanden in einem Peltier Thermalzykler statt (MJ Research, Watertown, MA, USA).

#### **3.4.7 Quantitative Real-time PCR (Heid et al., 1996)**

Für die quantitative PCR Analyse im TaqMan wurden für alle zu untersuchenden Gene mit Ausnahme des Kollagen Typ II Gens die SYBR® Green PCR Core Reagenzien benutzt (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). PCR Reaktionsprodukte wurden während des Reaktionsverlaufs über die direkte Detektion der Erhöhung der Fluoreszenz in einem ABI Prism® 7700 Sequenz Detektor (Applied Biosystems) gemessen, die durch Einbindung des SYBR® Green in doppelsträngige DNA entsteht.

Quantitative Genexpressionsanalysen wurden an lysierten EBs vorgenommen, aus denen RNA isoliert wurde (3.4.1.) und die korrespondierende cDNA synthetisiert wurde (3.4.5.). Die Reaktionsansätze enthielten 2,2 µl der Erststrangreaktion, je 0,2 µM dATP, dCTP und dGTP, 0,8 µM dUTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase und 0,5 U Uracil-N-Glycosylase in SYBR PCR Puffer. Reaktionen erfolgten in geschlossenen Reaktionsgefäßen (MicroAmp Optical Tubes und Caps, PE Applied Biosystems).

Zur Expressionsanalyse des Kollagen Typ II Gens, dass in zwei Spleißvarianten vorkommt, wurden während der TaqMan PCR neben den herkömmlichen sense und antisense Oligonukleotiden zwei spezielle fluorogene TaqMan Sonden eingesetzt. Diese Sonden bestehen aus Oligonukleotiden, deren Sequenz komplementär zu einer Teilsequenz des Kollagen Typ II Gens ist. Die eine ist spezifisch für den TYP IIA, die andere für den Typ IIB (2.8.). Am 5'-Ende haben die Sonden einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff (VIC - Typ IIA, FAM – Typ IIB) und am

3'-Ende einen Quencherfarbstoff (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin) über einen modifiziertes Nukleotid kovalent gebunden. Die Elongation der Sonde wird von einem die OH-Gruppe des 3'-Ende blockierenden Phosphatrest verhindert. Während der PCR hybridisiert die Sonde an die Zielsequenz, die von den jeweiligen sense und antisense Oligonukleotiden flankiert wird. Wird die intakte Sonde bei einer der spezifischen Wellenlänge des Reporterfarbstoffes angeregt, wird dessen Fluoreszenz aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencherfarbstoff (Fluoreszenz-Energietransfer) unterdrückt. Während der Elongation verdrängt die Taq DNA Polymerase die Sonde vom Matrizenstrang. Hierbei entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq Polymerase aktiviert wird, die zur Hydrolyse der TaqMan Sonde und damit zur räumlichen Trennung von Reporter- und Quencherfarbstoff führt. Dadurch wird auch der Fluoreszenz-Energietransfer unterbunden und das Fluoreszenzsignal des Reporters kann detektiert werden. Entsprechend der Akkumulation der Amplifikationsprodukte steigt die Fluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus an. Da sich das Fluoreszenzsignal der Sonden für Kollagen Typ II Typ IIA und Typ IIB auf Grund ihrer verschiedenen Markierung unterschied, konnten beide Spleißvarianten in einem einzigen TaqMan Lauf untersucht werden.

Die Reaktionsansätze für die TaqMan PCR mit den Kollagen Typ II Sonden enthielten 2,2 µl der Erststrangreaktion, je 0,8 µM sense und antisense Oligonukleotide, 0,8 µM TypIIA TaqMan Sonde, 0,8 µM TypIIB TaqMan Sonde, je 0,8 µM dATP, dCTP, dGTP und dUTP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase und 0,5 U Uracil-N-Glycosylase in PCR Puffer.

Die TaqMan-Zyklen begannen für alle untersuchten Gene mit einem initialen Inkubationsschritt (2 min, 50°C), in dem DNA Kontaminationen („Carry-over“ Kontaminationen) enzymatisch von der N-Uracil-Glycosylase verdaut wurden. Dieses Enzym wurde im folgenden Schritt inaktiviert und die Taq DNA Polymerase (95°C für 10 min) aktiviert, alle anderen PCR Bedingungen waren wie beschrieben (3.4.6.). Die spezifischen Produkte wurden mit den spezifischen Annealingtemperaturen (2.8.) über 45 Zyklen amplifiziert.

### **3.5 Histochemische Methoden**

#### **3.5.1 Nachweis von Kalzium**

##### **3.5.1.1 Alizarinrot S**

Alizarinrot S formt mit zweiwertigen Kationen wie Ca<sup>2+</sup>, aber auch Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> und Fe<sup>2+</sup> Chelatverbindungen. Keines dieser Elemente kommt allerdings neben Kalzium im Organismus in entsprechenden Konzentrationen vor, um verwechselt werden zu können.

Die EBs wurden nach Fixierung mit Methanol:Aceton (7:3) für 10 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit 0,5%iger wässriger Alizarinrot S Lösung (pH 4) bedeckt. Nach 5minütiger Inkubation bei RT wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen mit Aqua dest. gewaschen. Zur Entfernung etwaiger unspezifischer Anfärbungen wurden die Zellen in 70%, 80%, 90% und letztlich 100% Ethanol überführt. Kalziumsalze färbten sich intensiv orange bis gelbrot.

#### **3.5.1.2 Versilbern der Kalziumsalze nach von Kossa**

Kalzium in den Phosphaten und Karbonaten des Knochengewebes wird durch die von Kossa Färbung gegen Silberionen ausgetauscht, die anschließend zu metallischen Silber reduziert werden.

Die Zellen wurden dazu vom Medium befreit und mit einer 5%igen wässrigen Silbernitratlösung (Merck) überschichtet, die 20 Minuten unter einer 60-100 Watt starken Lampe auf die Zellen einwirkte. Die Zellen werden in Aqua dest. gespült und für 2 min in 5%iger Natriumthiosulfatlösung fixiert. Kalkhaltige Areale wurden vom Reagenz braunschwarz markiert.

#### **3.5.2 Färbung von Proteoglycanen mittels Alcian Blau**

Die Proteoglycane, die von den mit den entsprechenden Knorpelinduktionssubstanzen behandelten differenzierten Zellen in die extrazelluläre Matrix abgegeben wurden, wurden mit Alcian Blau angefärbt. Dazu wurden die Zellen in 2,5% Glutaraldehyd, 25 mM Natriumazetat, 0,4 M  $\text{MgCl}_2$  fixiert. Die Fixierlösung, die 0,05% Alcian Blau enthielt, wurde für 48h auf den Zellen belassen. Drei Waschschrte mit unterschiedlichen Entfärbelösungen (3% Essigsäure, 25% Ethanol in 3% Essigsäure, 50% Ethanol in 3% Essigsäure) entfernten die unspezifischen Bindungen. Zur Bildanalyse wurden die Zellen in 70% Ethanol aufgenommen.

#### **3.5.3 Immunhistochemische Färbung mit spezifischen Antikörpern**

Embryoid Bodies wurden bis zum gewünschten Zeitpunkt mit den verschiedenen Medien entlang der unterschiedlichen Linien differenziert und dann mit eiskaltem Methanol:Aceton (7:3) für 10 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Die Zellmembranen wurden für intrazellulär lokalisierte Antikörper mit 0,1% Triton-X 100 für 15 min bei RT in PBS permeabilisiert. Inkubation mit 10% FCS in PBS (30 min, RT) blockierte die unspezifischen Antikörperbindestellen. Die ersten Antikörper wurden auf die entsprechenden Arbeitskonzentrationen (2.7.1.) in PBS, 10% FCS verdünnt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht auf den differenzierten Zellen belassen. Der jeweilige zweite Antikörper wurde ebenfalls auf die richtige Arbeitsverdünnung gebracht (2.7.2.), die Lösung enthielt meist zusätzlich  $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$  bis-Benzimid (Höchst 33258, Sigma), um die Zellkerne anzufärben. Für 2h wurden die Zellen bei RT mit der Antikörperlösung beschichtet.

Zur Färbung der Zellen mit Kollagen Typ II wurde nach der Fixierung ein Pepsinverdau zwischengeschaltet. Die Zellen wurden mit 4 mg/ml Pepsin versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Färbung mit Proteoglycan erfolgte dieser Schritt mit 0,3 U/ml Chondroitinase ABC (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) in TAE-Puffer. Der Inkubationsschritt erfolgte hier für 1h bei Raumtemperatur.

Angefärbte EBs wurden in einem Leica Fluovert FU Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar) mit den entsprechenden Filtern betrachtet (2.7.2.). Die korrespondierenden Wellenlängen betrugen 270 nm und 380 nm für den Höchst Farbstoff.

### **3.6 Metachromatischer Test mit 1,9-Dimethylmethylenblau (Farndale et al., 1982 )**

Der Proteoglycangehalt in den differenzierten Knorpelzellen der Embryoid Bodies (EBs) wurde mit dem metachromatischen Test bestimmt. Die Proteoglycane wurden in 300 µl eines speziellen Proteoglycanextraktionspuffers (2.5.) für 48h bei 4°C extrahiert. Die restlichen nicht vollständig verdauten Zellen wurden vom Lysat durch Zentrifugation abgetrennt (13000 Upm, Eppendorf Tischzentrifuge, 20 min, 4°C). Zwei Drittel des Lysats wurden mit dem zehnfachen Volumen an DMMB-Reagenz vermischt und die Absorption des Farbstoffes in einem Spectra Fluor Plus Spektrophotometer (Tecan) bei 535 nm quantitativ gemessen. Die Konzentration der Proben wurden an einer Eichgeraden abgelesen. Als Standard diente Chondroitinsulfat C, das in verschiedenen Konzentrationen, ebenfalls mit DMMB-Reagenz versetzt, bei jeder Messung mitlief.

### **3.7 Fluorogene Nisslfärbung**

Die Nisslsubstanz ist einzigartig für Nervenzellen. Sie ist aus einer außergewöhnlichen Menge an rauhem endoplasmatischen Retikulum zusammengesetzt und reflektiert die ungewöhnlich hohe Proteinsynthesekapazität der neuronalen Zellen. Mit dem NeuroTrace™ Farbstoff der Firma Molecular Probes konnte sie in den EBs sichtbar gemacht werden.

Die entlang der neuronalen Linie differenzierten EBs oder die entsprechenden Kontrollen wurden für 10 min bei RT mit 0,1% Triton-X 100 in PBS gewaschen, um die Zellen zu permeabilisieren. Das NeuroTrace™ Nissl-Reagenz wurde 1:50 in PBS verdünnt und mit den Zellen bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der erforderlichen Inkubationszeit von 20 min wurden die Zellen über Nacht bei 4°C in PBS gewaschen und am nächsten Tag in einem Leica Fluoreszenzmikroskop bei 450/490 nm betrachtet.

### 3.8 Bestimmung der ALP-Aktivität

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) in den Osteoblasten wurde mit einem Reagenz von Sigma Diagnostics (Deisenhofen) bestimmt. Das Wirkprinzip beruht auf der Umsetzung des Substrates p-Nitrophenyl-Phosphat von der ALP zum gelben p-Nitrophenol und anorganischem Phosphat. Die Hydrolyse findet bei alkalischem pH-Wert statt und das gebildete p-Nitrophenol weist bei 405 nm ein Absorptionsmaximum auf. Das Verhältnis des Absorptionsanstiegs bei 405 nm ist der ALP-Aktivität direkt proportional.

Das Reagenz wurde in Aqua bidest. gelöst und auf 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden vom Medium befreit und direkt mit dem Reagenz überschichtet. Da die ALP ein membranständiges Enzym ist, kann sie so das Reagenz gut umsetzen. Die Zellen wurden in ein auf 37°C temperiertes Spektralphotometer gestellt und der Absorptionswert bei 405 nm sofort bestimmt (Initial). Nach 20 minütiger Inkubation bei der gleichen Temperatur wurde erneut die Absorption gemessen (Final). Die ALP Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet, wobei 18,45 für den millimolaren Extinktionskoeffizienten des p-Nitrophenol steht:

$$\text{ALP Aktivität [U/l]} = (((\text{Final}-\text{Initial})/20) \times 1000) / 18,45$$

### 3.9 Biostatistik

#### 3.9.1 Lineare Diskriminanzanalyse zur Auswertung des EST

Die lineare Diskriminanzanalyse wurde bei der Entwicklung des Prädiktionsmodells (PM) für den klassischen EST angewandt.

<u>Endpunkte:</u>	IC <sub>50</sub> 3T3	<u>Variablen:</u>	1	lg (IC <sub>50</sub> 3T3)
	IC <sub>50</sub> D3		2	lg (IC <sub>50</sub> D3)
	ID <sub>50</sub>		3	lg ((IC <sub>50</sub> 3T3-ID <sub>50</sub> ) / IC <sub>50</sub> 3T3))

#### Lineare Diskriminanzfunktionen:

- I: 5,9157 Variable 1 + 3,500 Variable 2 – 5,307 Variable 3 – 15,72  
 II: 3,651 Variable 1 + 2,394 Variable 2 – 2,033 Variable 3 – 6,85  
 III: -0,125 Variable 1 – 1,917 Variable 2 + 1,500 Variable 3 – 2,67

#### Klassifizierungskriterien:

Klasse I, nicht embryotoxisch:	I>II und I>III
Klasse II, schwach embryotoxisch	II>I und II>III
Klasse III, stark embryotoxisch	III>I und III>II

Abb. 4.: Endpunkte und Variablen des Prädiktionsmodells nach Spielmann et al. [1997].

Das PM vergleicht die verschiedenen Testendpunkte, die durch lineare Extrapolation aus den Konzentrations-Wirkungskurven entnommen werden, in Variablen und aus ihnen errechnete linearen Diskriminanzfunktionen.

### 3.9.2 Bestimmung der spezifischen Genexpressionen

Die verschiedenen Genexpressionen wurden nach Durchführung der RT-TaqMan PCR berechnet. In jedem TaqMan Lauf wurde für alle Proben in Dreifachbestimmung sowohl die Expression des spezifischen Zielgens wie auch die GAPDH Expression (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) ermittelt. Von der ABI PRISM™ Sequence detection software, Version 1.6.3. (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) wurden für jede Probe und jedes Gen C<sub>T</sub>-Werte berechnet. Der C<sub>T</sub>-Wert (Threshold-Cycle) ist der PCR Zyklus, an dem die Amplifikationskurven das Detektionslimit überschreiten. Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben zu gewährleisten, wurde die genspezifische Amplifikation auf die der GAPDH normiert. Hierzu wurde folgende Formel angewandt:

$$2^{-\Delta(\Delta C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ GAPDH})_{\text{Behandelt}} - (\Delta C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ GAPDH})_{\text{Kontrolle}}}$$

Hierdurch konnten Interpretationsfehler infolge von Unterschieden in der eingesetzten Menge der zu amplifizierenden cDNA ausgeschlossen werden.

### 3.9.3 Statistischer Vergleich

Statistische Vergleiche zwischen Kontrollen und behandelten Kulturen wurden mit dem gepaarten Student's t-Test über das Programm SigmaStat, Version 2,03 (SPSS Inc., San Rafael, CA, USA) erstellt. P-Werte kleiner als 0,1 wurden als statistisch signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Allgemeine Differenzierung embryonaler Stammzellen – Expressionsabnahme des Pluripotenzmarkers Oct4 im Verlauf der Embryoid Body Differenzierung

Der Transkriptionsfaktor Oct4 gilt als Marker für pluripotente, undifferenzierte Zellen. Anhand seiner Expression könnte der tatsächliche pluripotente Status der verwendeten Zellen überprüft werden. Die von den speziellen Kulturbedingungen über hängende Tropfen eingeleiteten Differenzierungsprozesse müssten zu einer Abnahme der Oct4 Expression führen. Mittels RT-PCR mit cDNA verschiedener Organe adulter Mäuse und embryonaler cDNA wurde die Eignung des Oct4 als Markergen für pluripotente undifferenzierte Zellen überprüft.

In ausdifferenzierten Geweben wie Herz, Gehirn, Leber, Lunge, Niere, Muskel, Knorpel sowie Fettgewebe ist die Oct4 Expression nicht gegeben (Abb. 5), wie über RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Oct4 Transkripte sind nur in undifferenzierten ES Zellen, in 12,5 Tage alten Embryos der Maus, Knochengewebe und mit genomischer DNA nachweisbar. Im Embryo können Oct4 Transkripte nachgewiesen werden, da zur RNA Isolation der gesamte Embryo benutzt wurde. Auf diese Weise sind die Transkripte aus den Genitalanlagen, einer Quelle für undifferenzierte Zellen, über RT-PCR als Signal zu erkennen. Das Amplicon in Knochengewebe könnte von der Anwesenheit des Knochenmarks im Knochen herrühren, in dem über das hämatopoetische System Blutzellen entstehen. Es ist denkbar, dass hier Zellen mit pluripotenten Eigenschaften als Mutterzellen der hämatopoetischen Stammzellen für das knochenspezifische Signal verantwortlich sind.



Abb. 5: Oct4 Expression in verschiedenen Geweben erwachsener Sv129 Mäuse, nachgewiesen über RT-PCR. Die verschiedenen Bahnen zeigen die entsprechenden Gewebe wie angegeben. H = Herz, G = Gehirn, L = Leber, N = Niere, LG = Lunge, M = Muskel, KN = Knochen, KP = Knorpel, F = Fettgewebe, E = Embryo 12,5 p.c., ES = undifferenzierte ES Zellen, GN = genomische DNA.

Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen die Eigenschaft des Oct4 als Markergen für pluripotente Zellen. Es sollte deshalb über die Oct4 Expression überprüft werden, wie sich die Pluripotenzeigenschaften der ES Zellen im Verlauf der Embryoid Body (EB) Differenzierung ändern. Dazu wurden ES Zellen nach der „hängenden Tropfen“ Methode kultiviert und zur Differenzierung gebracht (3.2.4.). An verschiedenen Tagen des Kulturverlaufs wurde die in ihnen

enthaltene RNA isoliert und die korrespondierende cDNA (3.4.1., 3.4.5.) wurde mit entsprechenden Oct4 Primern einer TaqMan PCR-Analyse unterworfen (3.4.7.).

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, sank die hohe Oct4 Expression, wie sie in undifferenzierten Zellen an Tag 0 detektiert werden konnte, dramatisch im Verlauf der EB Differenzierung. Schon an Tag 5 lag die Expressionsrate bei einem nur geringen Bruchteil der Expression in undifferenzierten Zellen. Dies lässt den Schluss zu, dass die ES Zellen tatsächlich nach Entzug des LIF ihre pluripotenten Eigenschaften verlieren, da sie in verschiedene somatische Zellen differenzieren.

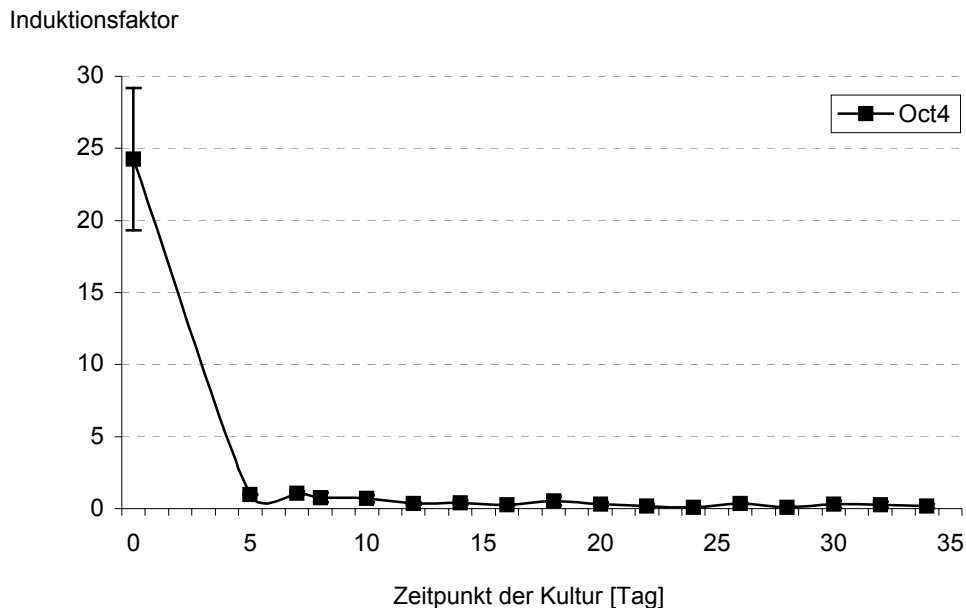


Abb. 6: Verlauf der Oct4 Expression während der ES Differenzierung in Embryoid Bodies, bestimmt mit quantitativer TaqMan PCR Analyse. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente normiert auf ihre Expression an Tag 5 der Kultur, also in undifferenzierten Stammzellen (gleichgesetzt mit 1).

## 4.2 Kardiogenese in embryonalen Stammzellen

Nach Verlust ihrer Pluripotenz aufgrund des Entzugs des sie kontrollierenden Faktors LIF differenzierten die ES Zellen spontan in die verschiedensten Zelltypen. Es entwickelten sich hauptsächlich Kardiomyozyten, die rhythmisch kontrahierten und deshalb sehr leicht zu identifizieren waren. Entsprechend der Aufgabenstellung wurde die allgemein angewandte Methode zur Differenzierung von Kardiomyozyten aus den embryonalen Stammzellen etabliert, der spezifische Zelltyp über Immunhistochemie identifiziert und es wurden geeignete herzspezifische Markergene ermittelt.



#### 4.2.1 Charakterisierung von Kardiomyozyten in Embryoid Bodies

Um die spontan auftretende Entwicklung von Kardiomyozyten in den Embryoid Bodies (EBs) nachzuweisen, wurden 12 Tage alte EBs, die nach der ‚hängenden Tropfen‘ Kultur differenziert wurden (3.2.4.), immunofluoreszent mit Antikörpern gegen herzspezifisches  $\alpha$ -/ $\beta$ -MHC und sarkomerisches Aktinin gefärbt (3.5.3.). Der verwendete MHC Antikörper ist speziell in der Lage, beide Isoformen des MHC zu detektieren. Sowohl das MHC wie auch das Aktinin stellen Markerproteine von ausdifferenzierten, voll funktionstüchtigen adulten Kardiomyozyten dar. Abbildung 7 zeigt deutlich, dass nur spezifische Zellen mit dem jeweiligen Antikörper markiert wurden (links), im Gegensatz zu allen vorhandenen Zellen, die über eine Kernfärbung mit *bis*-Benzimid sichtbar gemacht wurden (rechts). Zellen, die über die Färbung ihres Zytoplasmas mit  $\alpha$ -/ $\beta$ -MHC als Kardiomyozyten identifiziert werden konnten (Abb. 7A), zeigten ebenso die hoch organisierte sarkomerische Struktur des Aktinins (Abb. 7C).

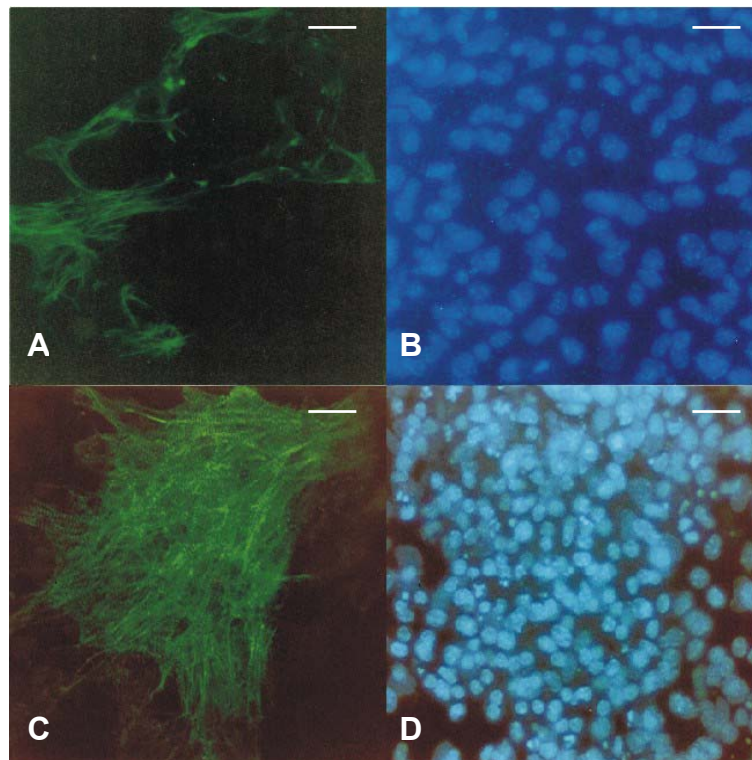


Abb. 7: Kardiomyozyten in 12 Tage alten Embryoid Bodies charakterisiert über indirekte Immunfluoreszenz mit (A) anti-  $\alpha$ -/ $\beta$ -MHC und (C) anti- sarkomerischem Aktinin. (B, D) zeigen die Kernfärbungen der Zellen in den entsprechenden Bildausschnitten, sichtbar gemacht über Färbung mit *bis*-Benzimid. Balken = 8,3  $\mu$ m (A, B), 13,3  $\mu$ m (C,D).

Bei optischer Inspektion der kontrahierenden Areale im EB an Tag 10 betrug der Anteil der Kardiomyozyten am gesamten EB schätzungsweise 15-25%. Dieser Wert konnte über die Anfärbung der Kardiomyozyten über Antikörper und ebenfalls durch Schätzung des

Kardiomyozytenanteils bestätigt werden. Der Anteil der kontrahierenden Zellen korrespondiert also mit dem geschätzten Anteil der durch die Antikörper identifizierten Kardiomyozyten.

Die Kardiomyozyten begannen bereits an Tag 8-9 der Kultur rhythmisch zu kontrahieren, die Zahl der kontrahierenden Areale und deren Größe nahmen jedoch mit zunehmender Kulturdauer wieder langsam ab [Wobus et al., 1991]. Ab der dritten Kulturwoche verschwanden die Kontraktionen ganz.

#### 4.2.2 Gewebespezifität des MHC Gens

Embryonale Stammzellen besitzen das Potential, spontan in mehrere Zelltypen differenzieren zu können. Deshalb arbeitet man auch bei Durchführung eines Protokolls zur Herzzelldifferenzierung mit einer Mischkultur unterschiedlicher Zelltypen, die neben den Kardiomyozyten ebenfalls im EB vorkommen. Um Zelltypen verschiedener Organe genetisch voneinander abgrenzen zu können, war es wichtig, für jedes zu untersuchende Organ jeweils spezifische Markergene zu finden.

Das für Kardiomyozyten am besten beschriebene Markerprotein ist das herzspezifische sarkomerische Myosin Heavy Chain (MHC). Robbins et al. zeigten 1990, dass beide Untereinheiten des korrespondierenden Gens in EBs transkribiert werden. Für quantitative TaqMan PCR Analysen als eine primäre Methode der vorliegenden Arbeit waren die von Robbins et al. benutzten Primer jedoch nicht anwendbar, da die im TaqMan zu amplifizierenden Produkte eine Länge von etwa 100 bp nicht überschreiten sollten, die Amplicons von Robbins aber 302 bp und 205 bp lang waren. Geeignete Oligonukleotidprimer wurden deshalb nach 2.8. generiert, spezifisch für die  $\alpha$ -Isoform und die  $\beta$ -Isoform des MHC Gens. Des weiteren wurde ein Primerpaar generiert (2.8.), das beide Isoformen simultan detektiert. Abbildung 8 veranschaulicht die Lage der Primer in der Sequenz der beiden Untereinheiten.

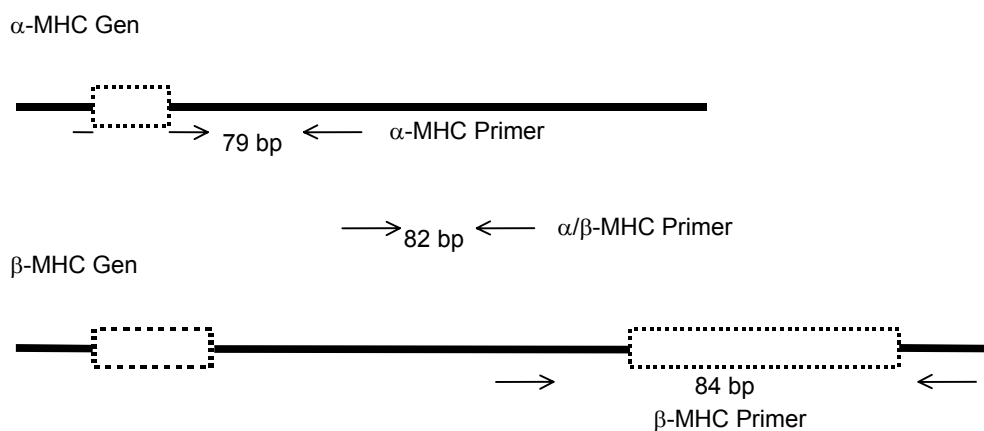


Abb. 8: Positionen der MHC Primer in den MHC Genen, verdeutlicht durch Pfeile. Die Länge der zu erwartenden Amplicons erscheint zwischen den Pfeilen. Gepunktete Linien indizieren Introns.

In einer RT-PCR (3.4.5., 3.4.6.) wurde untersucht, ob die drei Primerpaare fähig waren, ausgehend von der cDNA verschiedener Organe der erwachsenen Maus ein Amplicon der gewünschten Größe zu erzeugen. Zur Gewinnung der cDNA wurden die entsprechenden Gewebe nach 3.1. entnommen und die totale RNA isoliert (3.4.1.). Die erhaltene RNA wurde quantifiziert und in einer cDNA Synthese eingesetzt (3.4.3.; 3.4.5.).

Das  $\alpha$ -MHC Transkript ist auf Herz cDNA am stärksten ausgeprägt (Abb. 9), aber auch auf embryonaler cDNA (d12,5 p.c.) und auf cDNA von undifferenzierten ES Zellen ist ein Signal zu entdecken. Dasselbe gilt auch für die beiden anderen Primerpaare, allerdings erscheint kein Amplicon mit den  $\beta$ -MHC Primern auf undifferenzierten ES Zellen. Auf genomischer DNA kann von dem Primerpaar  $\alpha$ -MHC kein Amplicon nachgewiesen werden, da der Vorwärtsprimer genau über dem Intron liegt (Abb. 8). Die Oligonukleotide für  $\beta$ -MHC amplifizieren ein genomisches Transkript, dass etwa 550 bp lang ist und somit auf diesem Bildausschnitt nicht erscheint. Die genomischen Transkripte sind länger, da die in der genomischen DNA liegenden Introns mit amplifiziert werden. Nur das Primerpaar für  $\alpha$ -/ $\beta$ -MHC amplifiziert eine Bande der gleichen Länge wie auf cDNA.

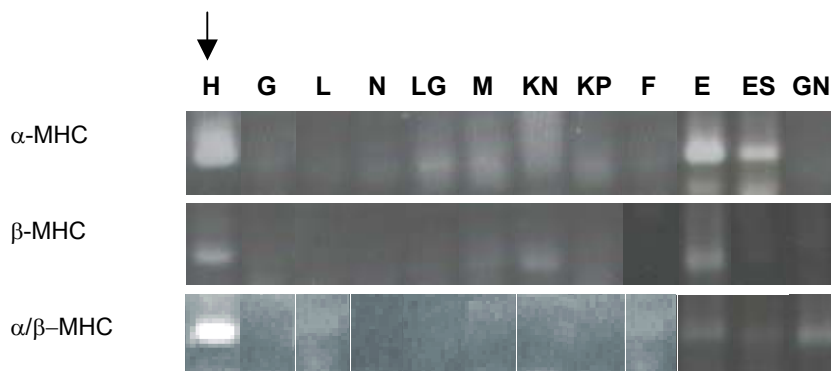


Abb. 9: Nachweis der verschiedenen MHC Transkripte in Herzgewebe (Pfeil) über RT-PCR. Die verschiedenen Bahnen zeigen die entsprechenden Gewebe wie angegeben. H = Herz, G = Gehirn, L = Leber, N = Niere, LG = Lunge, M = Muskel, KN = Knochen, KP = Knorpel, F = Fettgewebe, E = Embryo 12,5 p.c., ES = undifferenzierte ES Zellen + LIF, GN = genomische DNA.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle drei Primerpaare in der Lage waren, spezifisch in kardiärem Gewebe ihr korrespondierendes Amplicon zu detektieren. Mit dem MHC Gen wäre folglich ein Markergen identifiziert, dass ausschließlich im Herzen exprimiert wird.

#### 4.2.3 Kinetische Analyse der MHC Expression

Der Verlauf der Expression der MHC Isoformen wurde im Zyklus der Kulturphase der EBs mittels der quantitativen TaqMan PCR Analyse untersucht. Embryonale Stammzellen wurden nach 3.2.4. der „hängenden Tropfen“- Kultur unterzogen und an verschiedenen Tagen die EBs lysiert. Die in ihnen enthaltene mRNA wurde nach Punkt 3.4.1. isoliert, quantifiziert (3.4.3.) und in cDNA

umgeschrieben (3.4.5.). Die so gewonnene cDNA wurde nachfolgend in einer TaqMan PCR mit den jeweiligen Primern der MHC Isoformen eingesetzt 3.4.7.

Beginnend mit Tag 5 der Kultur konnte ein Anstieg der Expression beider MHC Isoformen nachgewiesen werden (Abb. 10), detektierbar mit allen drei Primerpaaren.

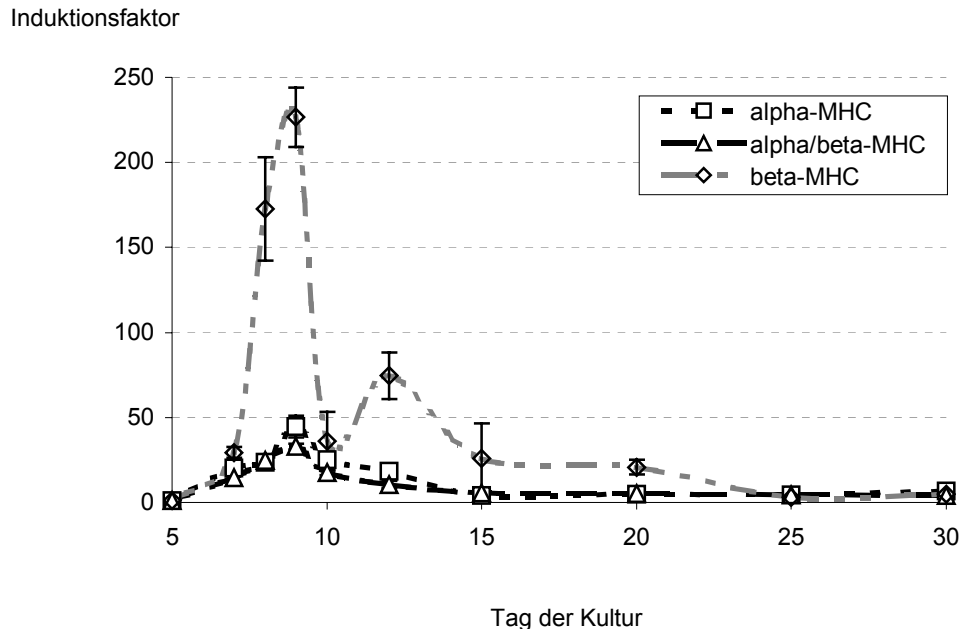


Abb. 10: Kinetik der MHC Expression über 30 Tage der ES Zelldifferenzierung. Gezeigt sind die Expressionen der verschiedenen Isoformen, normiert auf ihre Expression an Tag 5 der Kultur. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$ .

Bei diesen ersten Versuchen wurde noch auf die unter 3.9.2. beschriebene Normierung der MHC Expression auf die GAPDH Expression verzichtet. Spätere Versuche zeigten, dass die relativen Veränderungen der Expression bei Normierung auf die GAPDH Expression sich nicht wesentlich von den unnormierten unterschieden und deshalb wurde auf die Wiederholung der hier gezeigten Experimente verzichtet. Die Einheiten der y-Achse beziehen sich hier auf die Menge an Amplicon bezogen auf eine Standardreihe von muriner kardiärer cDNA. Die Induktionsfaktoren ergaben sich, indem die Expressionswerte der späteren Zeitpunkte auf den jeweils für Tag 5 ermittelten Wert normiert wurden.

Der Scheitelpunkt der Expressionskurve wurde für Tag 8-9 registriert. Während der Verlauf der  $\alpha$ -MHC und der  $\alpha$ -/ $\beta$ -MHC Expression von Tag 9 an kontinuierlich abnimmt, um an Tag 15 wieder einen Basiswert zu erreichen, ist die  $\beta$ -MHC Expression an Tag 12 nochmals etwas erhöht, folgt dann jedoch auch dem Verlauf der  $\alpha$ -MHC und der  $\alpha$ -/ $\beta$ -MHC Expression. Die generelle Abnahme der MHC Expression ab Tag 15 entspricht somit qualitativ der Beobachtung, dass die kontraktilen Elemente innerhalb der EBs ab der dritten Woche der Kultur ihre Tätigkeit beenden.

### 4.3 Neurogenese in embryonalen Stammzellen

Neuronale Zellen sind im Gegensatz zu Kardiomyozyten selten während der autonomen spontanen Differenzierung der ES Zellen *in vitro* zu finden. Um die Ausbeute neuronaler Zelltypen zu erhöhen, wurden in der Vergangenheit spezifische Protokolle etabliert, etwa die Induktion über Retinolsäure und die Selektion der neuronalen Differenzierungslinie. Beide Protokolle wurden mittels Charakterisierung der entstandenen Zellen über Immunhistochemie und Expressionsanalyse neuronaler Gene verglichen.

#### 4.3.1 Identifizierung von Markergenen für Nervenzellen

Zur vergleichenden Analyse neuronaler Genexpressionsmuster der beiden Differenzierungsprotokolle wurden Primerpaare für die verschiedenen in der Literatur bekannten neuronalen Gene generiert. Zur gleichzeitigen Ermittlung von neuronalen Markergenen wurden diese Primerpaare in einer RT-PCR mit den verschiedenen cDNAs von adultem Gewebe eingesetzt.

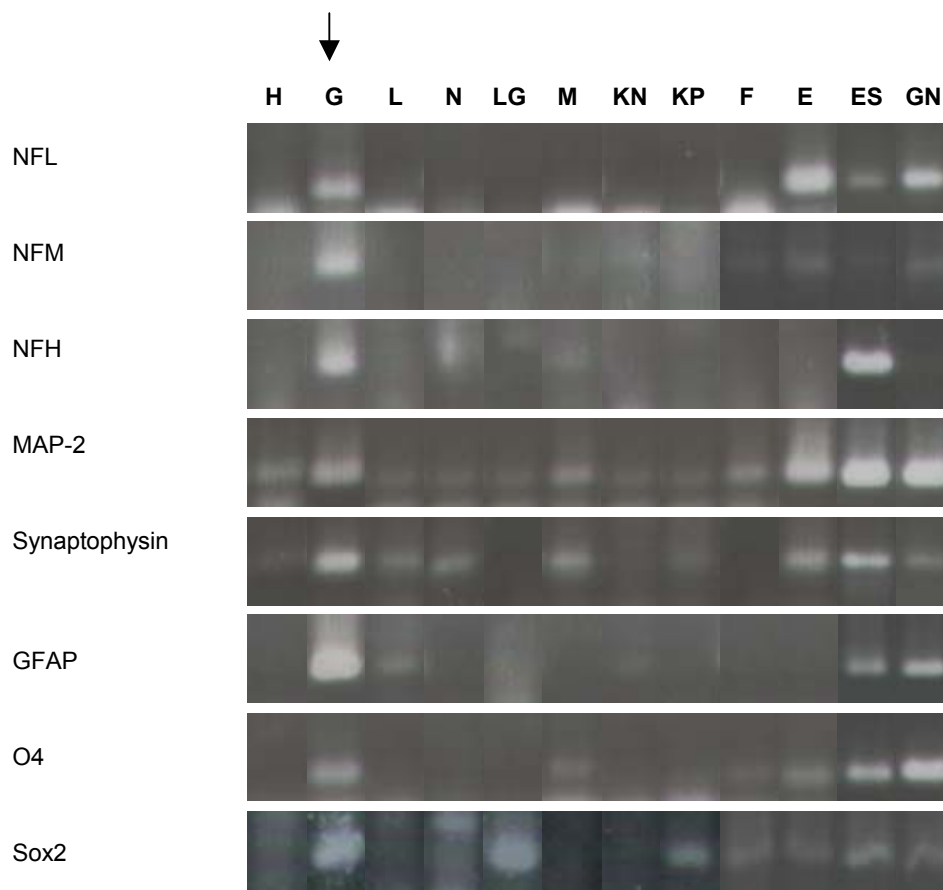


Abb. 11: Nachweis der verschiedenen in der Literatur beschriebenen neuronalen Transkripte über RT-PCR in verschiedenen Geweben. Die verschiedenen Bahnen zeigen die entsprechenden Gewebe wie angegeben. H = Herz, G = Gehirn (Pfeil), L = Leber, N = Niere, LG = Lunge, M = Muskel, KN = Knochen, KP = Knorpel, F = Fettgewebe, E = Embryo 12,5 p.c., ES = undifferenzierte ES Zellen + LIF, GN = genomische DNA.

Neurone und Gliazellen lassen sich über verschiedene Marker voneinander abgrenzen, von denen die meisten mit ihrem Zytoskelett zu tun haben. Die Neurofilamente der verschiedenen molekularen Gewichtsklassen NFL, NFM und NFH werden spezifisch nur im Gehirn exprimiert (Abb. 11). Nur NFL ist bereits an Tag 12,5 p.c. im Embryo detektierbar. Die für NFL spezifischen Primer detektieren auf genomischer DNA ein Signal, dass die gleiche Größe zeigt wie auf cDNA. Die Primer für NFM und NFH dagegen umspannen ein Intron, so dass das Amplicon auf genomischer DNA länger ist und somit auf diesem Bildausschnitt nicht erscheint. Undifferenzierte Stammzellen exprimieren nur NFL und NFH, ersteres in sehr geringen Mengen, nicht aber NFM.

Das MAP-2 ist als Mikrotubuli assoziiertes Protein zwar dominant im Gehirn vertreten, lässt sich aber auch in geringen Mengen in anderen Organen finden. Auch Synaptophysin ist in mehreren Organen vertreten. Beide werden sowohl in undifferenzierten ES Zellen wie auch in 12,5 Tage alten Embryos exprimiert. GFAP und O4 sind spezifisch auf Gehirn- cDNA beschränkt. Undifferenzierte Stammzellen exprimieren schon geringe Mengen dieser Transkripte, 12,5 Tage alte Embryos nicht. Das Signal von MAP-2, Synaptophysin, GFAP und O4 auf genomischer DNA und cDNA korrespondiert miteinander.

Der neuronale Transkriptionsfaktor Sox2 zeigt seine höchste Expression im Gehirn, ist aber auch in Lunge und Knorpel vertreten.

#### **4.3.2 Induktion der Neurogenese mit *all-trans* Retinolsäure**

##### **4.3.2.1 Charakterisierung der über Retinolsäure induzierten Nervenzellen in Embryoid Bodies**

Retinolsäure ist in der Lage, einen Differenzierungsweg in totipotenten frühen embryonalen Zellen zu aktivieren, der zur Expression multipler neuronaler Gene und Phänotypen führt. In der Peripherie der EBs formierten die differenzierenden Zellen im Verlauf der von Retinolsäure induzierten Entwicklung epitheliale, vaskuläre und auch muskuläre Strukturen. In derselben peripheren Zone bildeten sich auch die Neurone. Lange Neuriten sprossen aus den Zellen, etablierten Zell-Zell-Kontakte und initiierten so ein interneuronales Netzwerk (Abb. 12A). Die Nisslfärbung zeigte in Retinolsäure-induzierten Kulturen kleine Zellaggregate, die sich in den Kontrollen nicht bildeten (Abb. 12 B, C). Diese Aggregate wurden von vielen Antikörpern gegen neuronale Proteine erkannt und somit als Aggregate neuronaler Zellen identifiziert (Abb. 12 D-I, Abb. 13). Die Färbung der Neurofilamente zeigte speziell die interneuronalen Verbindungen, die durch Ausbildung der Dendriten zustande kamen (Abb. 12 D-I). Die Zellen mit Neuriten zeigten an Tag 11 der Kultur ferner eine positive Immunfärbung mit anti-NSE und anti-Synaptophysin. Synaptophysin war vermehrt in den Zellaggregaten lokalisiert, da dort die synaptischen Verschaltungen der Zellen ablaufen.



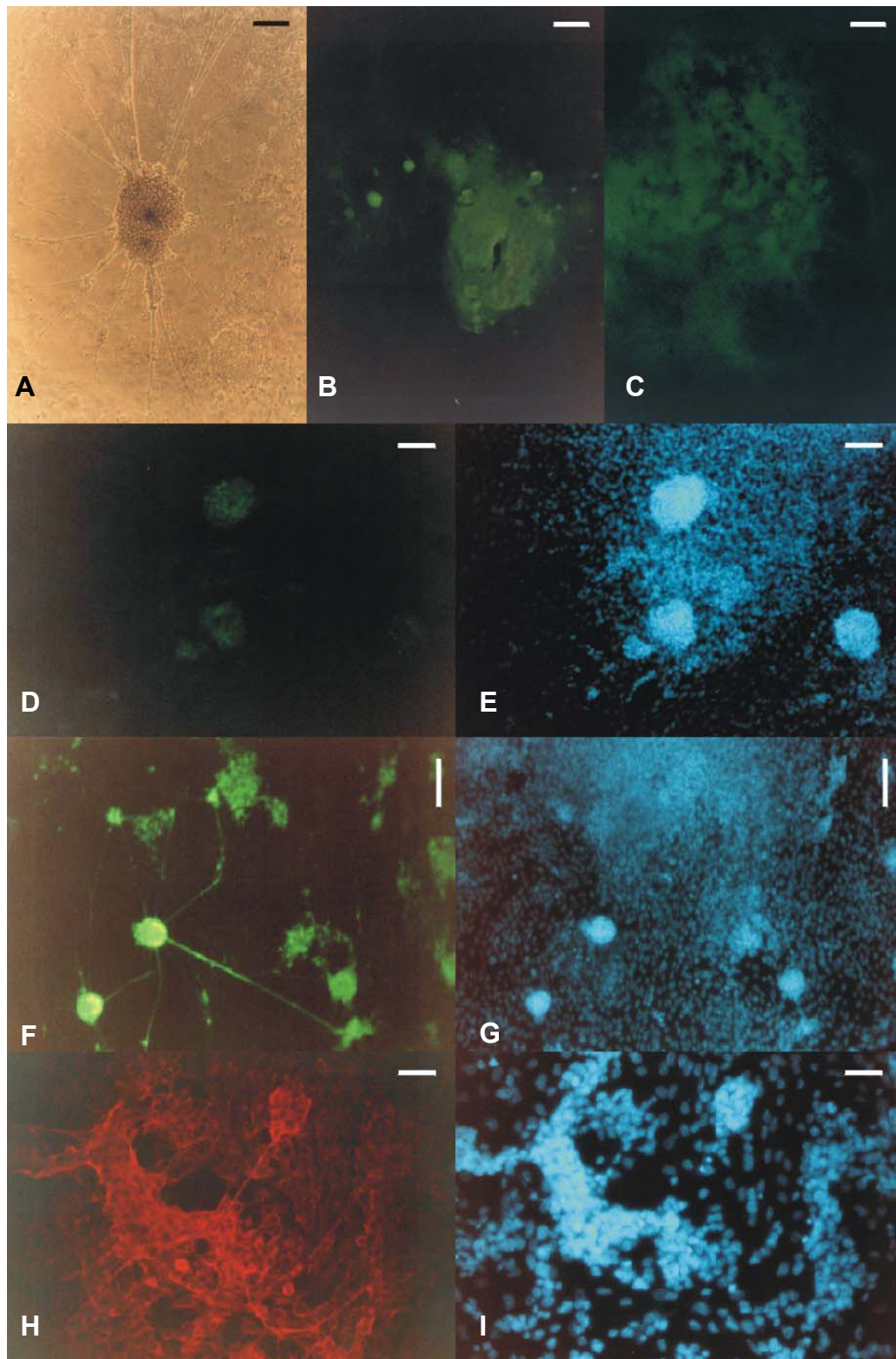


Abb. 12.: Embryoid Bodies an Tag 11 der Differenzierung, Retinolsäure induziert [ $5 \times 10^{-8}$  M] (A) Phasenkontrastaufnahme aggregierter neuronaler Zellen mit aussprossenden Dendriten, Balken 13,3  $\mu\text{m}$ . (B, C) Nisslfärbung, Balken 106  $\mu\text{m}$ . (B) Supplementiert mit Retinolsäure. (C) Kontrolle. (D-I) Immunfärbung für neuronale Marker. (D) Anti- NFL. (F) Anti- NFM. (H) Anti- NFH. (E), (G) und (I) entsprechen dem gleichen Bildausschnitt wie (D), (F) und (H), Kernfärbung mit *bis*-Benzimid. (D-G) Balken 26,7  $\mu\text{m}$ , (H, I) Balken 13,3  $\mu\text{m}$ .

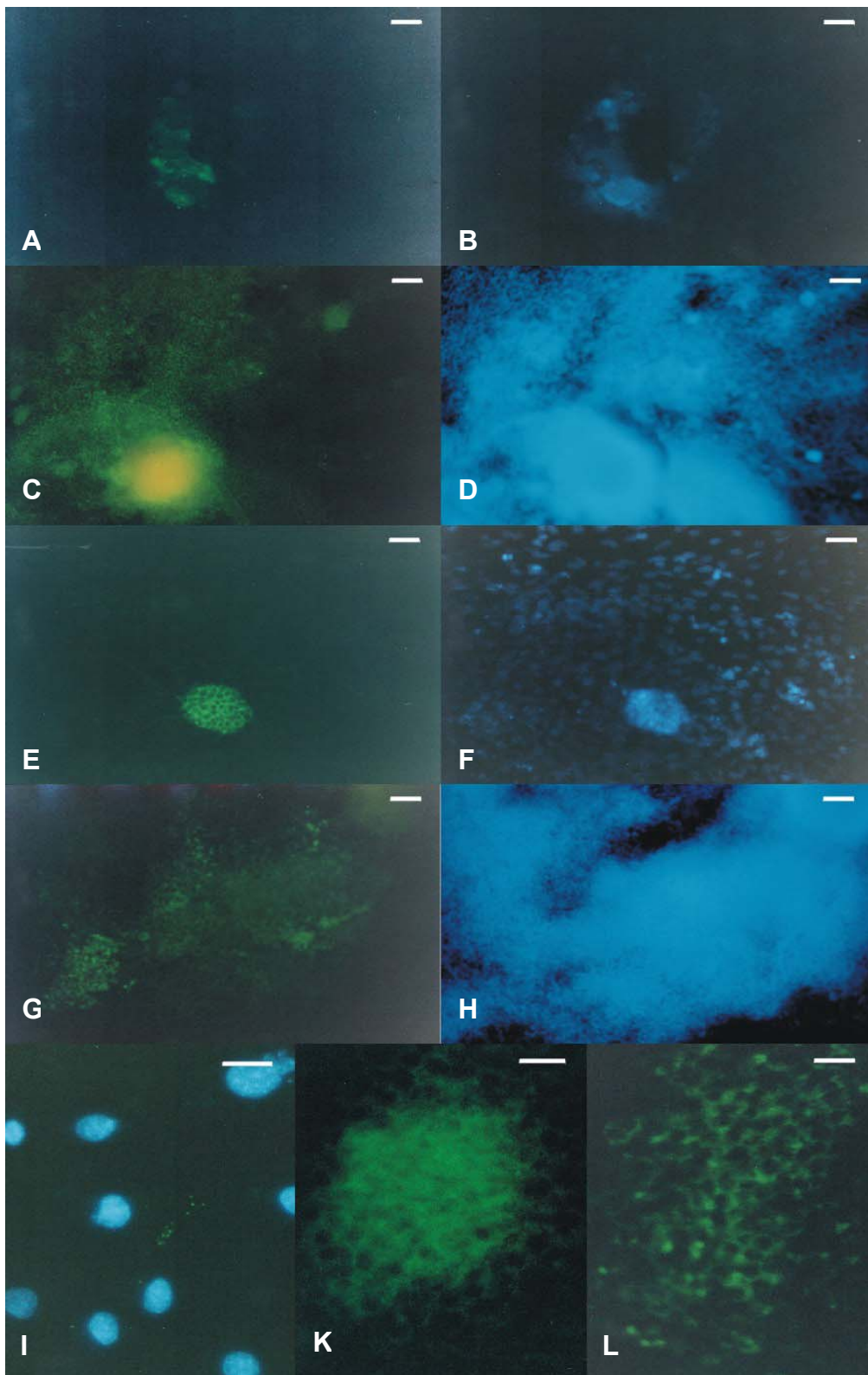


Abb. 13.: Immunfärbung für neuronale Marker an Retinolsäure induzierten Embryoid Bodies an Tag 11 der Differenzierung [ $5 \times 10^{-8}$  M]. (A, B) Anti-NSE, Balken 96  $\mu\text{m}$ . (C, D) Anti-Synaptophysin, Balken 12  $\mu\text{m}$ . (E, F) Neurone, die sich positiv mit MAP-2 anfärben lassen, Balken 38  $\mu\text{m}$ . (G, H) Anti-oligodendrozytenspezifisches Protein, Balken 24  $\mu\text{m}$ . (B), (D), (F) und (H) entsprechen dem gleichen Bildausschnitt wie (A), (C), (E) und (G), Kernfärbung mit *bis*-Benzimid. (I – L). Vergrößerte Darstellung der spezifischen Färbungen, Balken 7,5  $\mu\text{m}$ . (I) Anti-NSE. (K) Anti-Synaptophysin. (L) Anti-oligodendrozytenspezifisches Protein.



Der anti-MAP-2 Antikörper färbte kurze dicke Zellfortsätze und Zellkörper. Oligodendrozyten konnten über Färbung mit einem Antikörper gegen oligodendrozytenspezifisches Protein sichtbar gemacht werden. GFAP konnte mit Antikörpern an Tag 11 der Kultur nicht identifiziert werden.

#### 4.3.2.2 Einfluss von Retinolsäure auf die Expression neuronaler und entwicklungsspezifischer Gene

Unter Verwendung der quantitativen TaqMan PCR Analyse wurde die Varianz der RNA Expressionswerte in Antwort auf verschiedene Konzentrationen von Retinolsäure gemessen (Abb. 14). Retinolsäure wurde a) an den Kulturtagen 1-3, also während der Ausbildung der EBs in den hängenden Tropfen und b) an den Tagen 3-5 während der Suspensionskultur zu den ES Zellen gegeben. Totale RNA wurde an Tag 11 extrahiert (3.4.1.), in cDNA umgeschrieben (3.4.5.) und einer TaqMan PCR Analyse (3.4.7.) unterzogen.

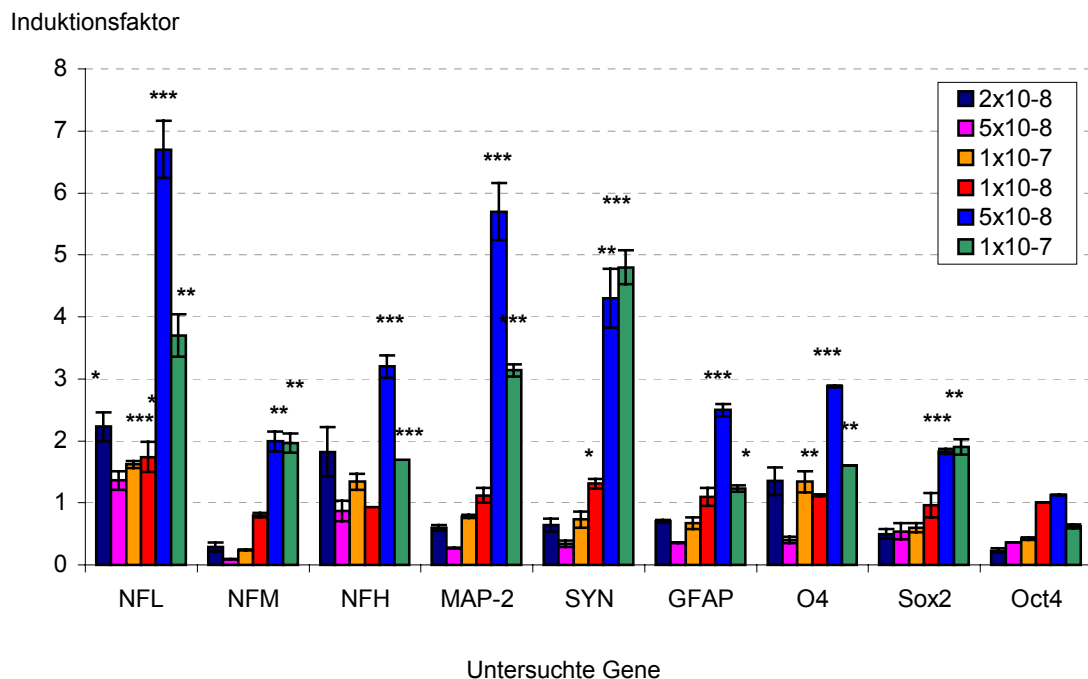


Abb. 14.: Einfluss verschiedener Konzentrationen an Retinolsäure (s. Legende) auf die Expression neuronaler Gene, bestimmt über TaqMan PCR. Die verschiedenen Konzentrationen wurden entweder von Tag 1-3 der Kultur appliziert (Kolumnen 1-3) oder an Tag 3-5 (Kolumnen 3-6). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Induktionsfaktoren normiert auf die GAPDH Expression im Vergleich zur nicht supplementierten Kontrolle, die als 1 gesetzt wurde, n = 3. \*P< 0,1; \*\*P< 0,01; \*\*\*P= 0,001.

Im Vergleich zur Kontrolle war die Expression der Neurofilamente und der neuronalen Gene MAP-2 und Synaptophysin signifikant zu den Retinolsäurekonzentrationen  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  und  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  erhöht, wenn Retinolsäure während der Kulturtage 3 und 5 appliziert wurde ( $P < 0,01$  oder  $P = 0,001$ ). Die optimale Retinolsäurekonzentration zur Induktion von Nervenzellen liegt offenbar bei  $5 \times 10^{-8} \text{M}$ , da

bei dieser Konzentration die stärksten Expressionssteigerungen verzeichnet werden konnten. Das kleinste der Neurofilamente wurde bei dieser Konzentration gegenüber der Kontrolle um das 6,7-fache hochreguliert ( $P = 0,001$ ). Die NFM und NFH Werte wurden 2-fach bzw. 3-fach erhöht ( $P < 0,01$ ,  $P = 0,001$ ). Die MAP-2 und Synaptophysin Expressionen stiegen bei dieser Retinolsäurekonzentration auf das 5,5-fache ( $P = 0,001$ ) bzw. das 4,5-fache der Kontrollwerte ( $P < 0,01$ ).

Retinolsäure  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  gegeben an Tag 3-5 führte zu keiner signifikanten Expressionsänderung. Appliziert an den Kulturtagen 1-3 führte Retinolsäure ebenfalls zu keiner Expressionssteigerung der neuronalen Gene. Die Expressionsspiegel des NFM, MAP-2, Synaptophysin, GFAP und Sox2 waren im Gegenteil signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert. Während die Zellen angeregt wurden, wenn Retinolsäure in der Suspensionskultur (Tag 3-5) gegeben wurde, waren die EBs viel kleiner, wenn Retinolsäure zur Zeit der Bildung der EBs im hängenden Tropfen (Tag 1-3) gegeben wurde.

Auf Genexpressionsebene fand sich eine etwa 2,5-3-fache Erhöhung der Expression der Marker GFAP für Astrozyten und des O4 für Oligodendrozyten ebenfalls bei Behandlung mit  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  Retinolsäure in Suspensionskultur.

Die Expression des neuronalen Transkriptionsfaktors Sox2 erreichte bei Supplementation mit  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  und  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  Retinolsäure ab Tag 3 bis 5 ein Niveau, das 2-fach über dem der Kontrolle lag ( $P = 0,001$  und  $P < 0,01$ ). Unter Einfluss von Retinolsäure war die Expression des Transkriptionsfaktors Oct4, der als Marker für undifferenzierte Zellen identifiziert wurde (4.1.) dagegen im Vergleich zur Kontrolle abgesenkt. In 11 Tage alten supplementierten EBs befanden sich also weitaus weniger undifferenzierte pluripotente Zellen als in den Kontrollen, ein Zeichen für die allgemeine Differenzierung der Zellen verbunden mit dem Verlust der Pluripotenz.

#### **4.3.2.3 Kinetische Analyse der Expression neuronaler und entwicklungsspezifischer Gene in Gegenwart von Retinolsäure**

Es konnte durch die vergleichende Expressionsanalyse der neuronalen Gene gezeigt werden, dass die Suspensionskultur eine kritische Phase der neuronalen Entwicklung in Embryoid Bodies ist. Weitere Versuche mit Retinolsäure wurden deshalb an den Tagen 3-5 in einer Konzentration von  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  durchgeführt. Es wurde weiterhin untersucht, wie sich die neuronalen Gene im zeitlichen Verlauf der Retinolsäure induzierten Differenzierung verhalten (Abb. 15).

Die Induktionsfaktoren der einzelnen Gene an den entsprechenden Tagen der Kultur wurden auf den jeweiligen Expressionswert an Tag 5 normiert.

Die Expression der Neurofilamente stieg beginnend mit den ersten Kulturtagen kontinuierlich an. An Tag 11 fanden NFL und NFM ihre Maximalexpression mit Werten, die 10-fach über denen an Tag 5 liegen ( $P = 0,001$ ). NFH war zwar an Tag 11 ebenfalls exprimiert, stieg aber im Gegensatz zu den beiden leichteren Filamenten, deren Expressionsspiegel ab Tag 11 absanken, noch weiter

an. Auch die Expressionsniveaus von MAP-2 und Synaptophysin fanden an Tag 11 ihr Maximum. Gegenüber Tag 5 waren ihre Expressionsspiegel ungefähr um das 4-fache erhöht ( $P = 0,001$ ). Die Expressionsniveaus des Oligodendrozytenmarkers O4 übertraf über die gesamte Kulturdauer niemals den 2-fachen Wert der Tag 5 Expression. An Tag 11, an dem die neuronalen Marker maximal exprimiert wurden, war die O4 Expression aber dennoch signifikant gegenüber Tag 5 erhöht. Die Expression des Astrozytenmarkers GFAP erreichte an Tag 11 das 2-fache Niveau im Vergleich zu Tag 5 ( $P < 0,1$ ). Seine Expression stieg erst in der dritten Kulturwoche noch deutlicher an ( $P = 0,001$ ).

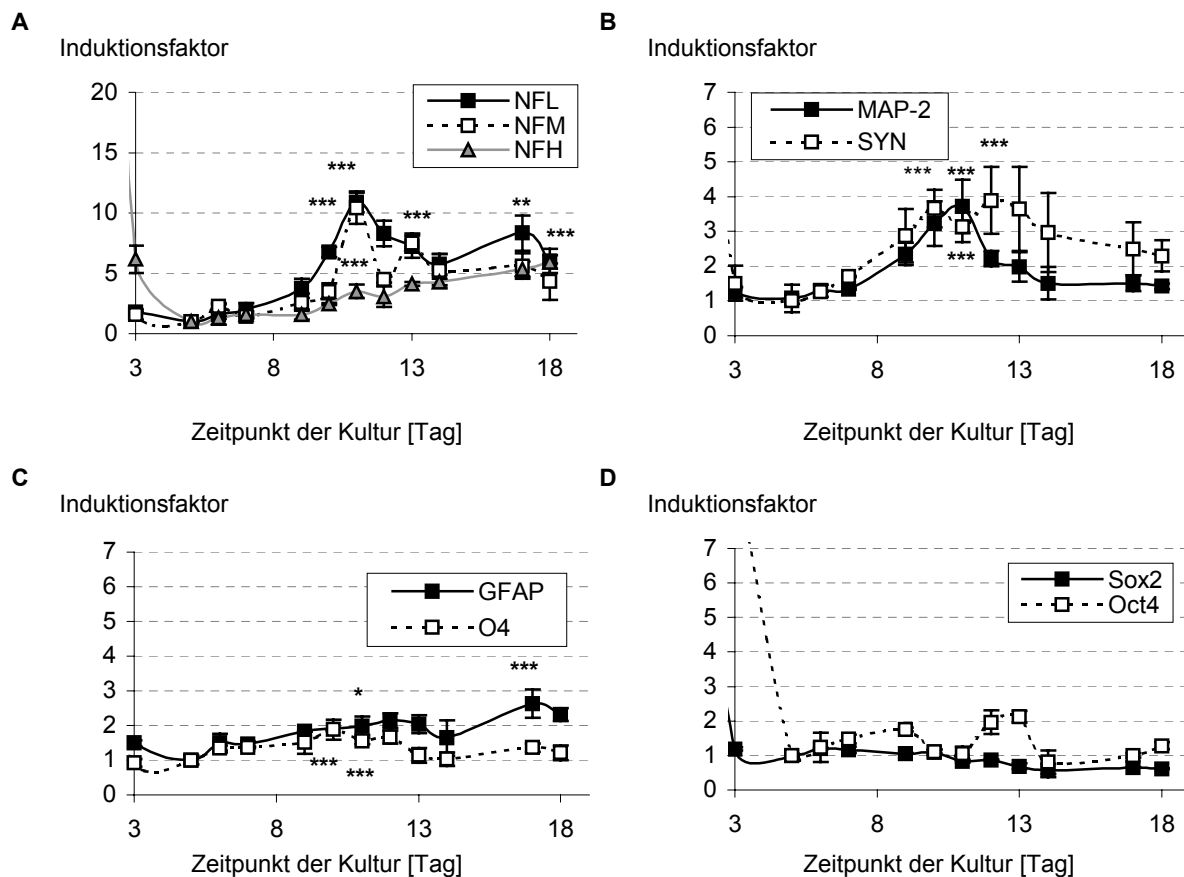


Abb. 15.: Expression der neuronalen und entwicklungsspezifischen Gene im Verlauf der EB Differenzierung induziert durch Retinolsäure. (A) Neurofilamente (B) MAP-2 und Synaptophysin. (C) Astrozytenmarker GFAP, Oligodendrozytenmarker O4. (D) Transkriptionsfaktor Sox-2 und Pluripotenzmarker Oct4. Die Ergebnisse zeigen den Induktionsfaktor der Expression normiert auf die GAPDH Expression im Vergleich zur Expression an Kulturtag 5 (Faktor 1, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$  unabhängige Experimente, jeweils 20 EBs). \* $P < 0,1$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P = 0,001$ .

Die Expression des neuronalen Transkriptionsfaktors Sox2 war schon vor Tag 3 auf einem Maximum. Der Induktionsfaktor des Sox-2 Gens liegt um Faktor 20 höher als an Tag 5 (in Abb. 15 nicht ersichtlich). Die Anlage der neuronalen Zellen findet demnach zu einem sehr frühen Zeitpunkt der EB Differenzierung statt. Ab Tag 5 wurde seine Expression stark herunterreguliert, stieg aber dennoch an Tag 9 und nochmals an den Tagen 12-13 auf den 2-fachen Spiegel der Tag 5

Expression an. Auch die Oct4 Expression sank im Vergleich zu Tag 1 ab und hielt sich bis zum Beginn der dritten Kulturwoche auf dem gleichen Level wie an Tag 5, um danach noch weiter abzufallen. Somit wäre auch in dieser Differenzierungslinie gezeigt, dass die anfangs vorhandenen pluripotenten Zellen sich zu ausdifferenzierten somatischen Zellen entwickeln.

### **4.3.3 Induktion der Neurogenese über Selektion**

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde vergleichend zum Differenzierungsprotokoll mit Retinolsäure die Linienselektion zur neuronalen Differenzierung durchgeführt, um zu analysieren, ob die Generierung neuronaler Zellen ebenso effizient abläuft. Die ES Zellen wurden dazu in den vier Phasen der Linienselektion wie unter 3.2.5.2. beschrieben supplementiert.

#### **4.3.3.1 Charakterisierung der über Selektion entstandenen Nervenzellen**

Die ES Zellen wurden in hängenden Tropfen nach 3.2.4. aggregiert, aber die entstandenen EBs erst einen Tag später als üblich, also am sechsten Kulturtag auf die 24-Loch Zellkulturplatten transferiert. Dort erhielten sie an Tag 7 der Kultur ITSFn Medium, welches spezifisch mit Faktoren angereichert war, die das Wachstum neuronaler Zellen unterstützt. Während der ersten 72 h unter Einfluss des ITSFn Mediums löste sich ein Teil der Zellen von der Kulturplatte ab. Die verbliebenen angehefteten Zellen änderten ihre Morphologie von eng zusammenliegenden epithelialen Zellen zu kleinen länglichen Zellen. Nach etwa 5-7 Tagen im ITSFn Medium zeigten fast alle Zellen diese für neuronale Zellen typische Form. In der dritten Phase der Kultur wurden die Zellen vereinzelt, wobei die sich bis dahin ausgebildeten Dendriten und neuronalen Verschaltungen wieder zerstört wurden. Unter Einfluss der weiteren selektiven Faktoren (bFGF, Progesteron, Putrescin) bildeten sich die Axone neu und die Synapsen wurden wieder angelegt. Der Anteil der Zellen mit neuritischen Fortsätzen in der vierten Kulturphase machte nach optischer Schätzung über 50% aus. Dieser Anteil konnte über Färbung der Zellen mit Antikörpern gegen neuronenspezifische Proteine identifiziert werden (Abb. 16, Abb. 17).

Die Nisslfärbung für neuronale Zellen verdeutlichte, dass trotz der Vereinzelung der Zellen wieder kleine Zellzusammenschlüsse entstanden (Abb. 16A). Die einzelnen Zellen zeigten deutlich die typische polarisierte Form neuronaler Zellen mit kurzen Dendriten und den längeren Axonen (Abb. 16 B). Die verschiedenen Neurofilamente wurden in einem großen Anteil der Zellen exprimiert (Abb. 16 C-K).

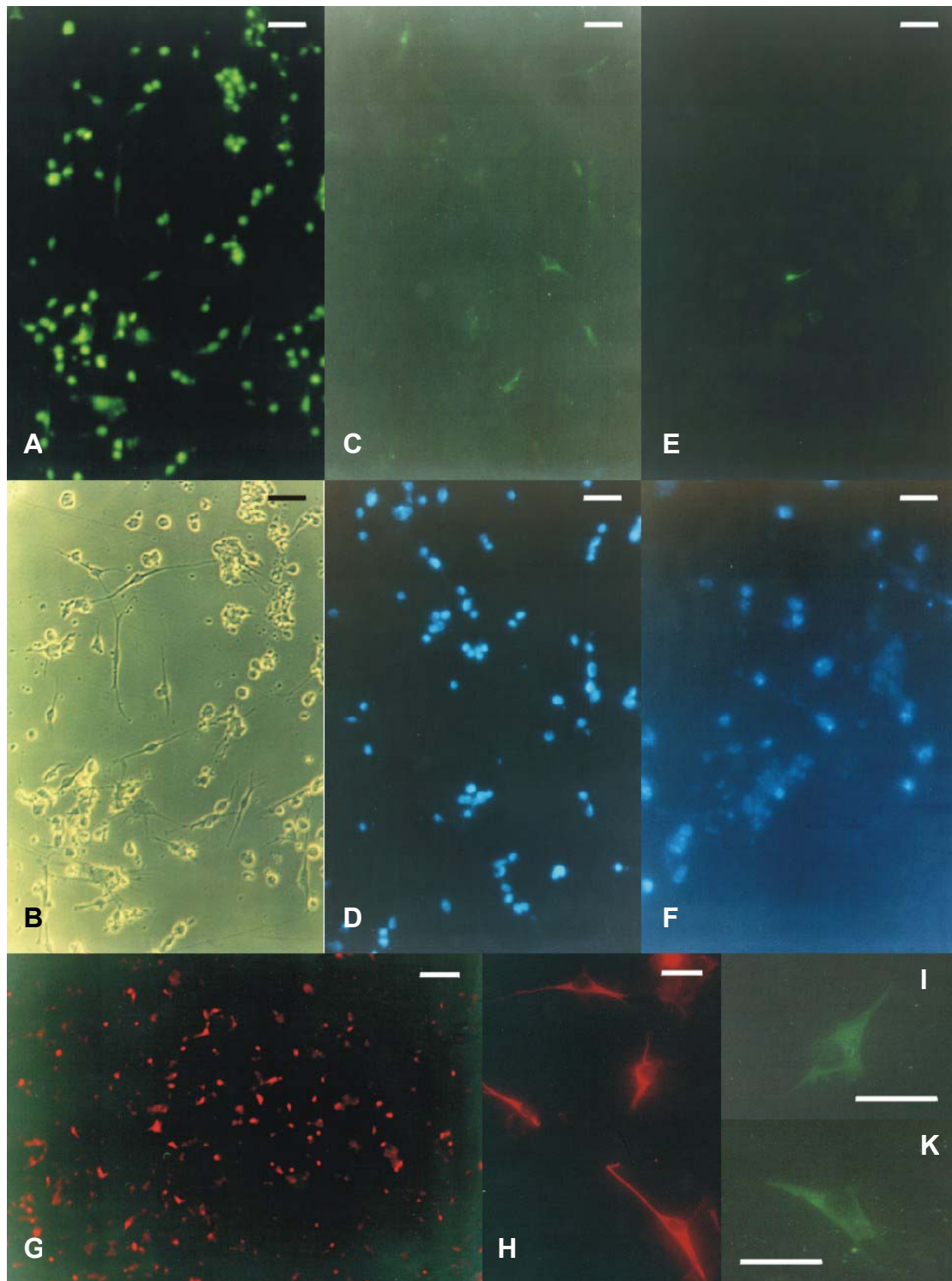


Abb. 16: Embryonale Stammzellen an Tag 30 der neuronalen Differenzierung über Linienselektion (A) Nisslfärbung der dissoziierten Zellen, Balken 13,3  $\mu\text{m}$ . (B) Phasenkontrastaufnahme des gleichen Bildausschnittes wie in (A). Zu erkennen sind aggregierte und vereinzelte neuronale Zellen mit Dendriten, Balken 13,3  $\mu\text{m}$ . (C-K) Immunfärbung für neuronale Filamente. (C, D) Anti- NFL, Balken 13,3  $\mu\text{m}$  (E, F) Anti- NFM, Balken 6,7  $\mu\text{m}$ . (D) und (F) entsprechen dem gleichen Bildausschnitt wie (C) und (E), Kernfärbung mit *bis*-Benzimid (G) Anti- NFH, Balken 53,3  $\mu\text{m}$ . (H) Ausschnittsvergrößerung eines mit anti-NF 200 gefärbten Neurons, Balken 6,7  $\mu\text{m}$ , (I, K) Vergrößerte Darstellung zweier Zellen, die sich mit anti-NFL färben lassen, Balken 6,7  $\mu\text{m}$ .

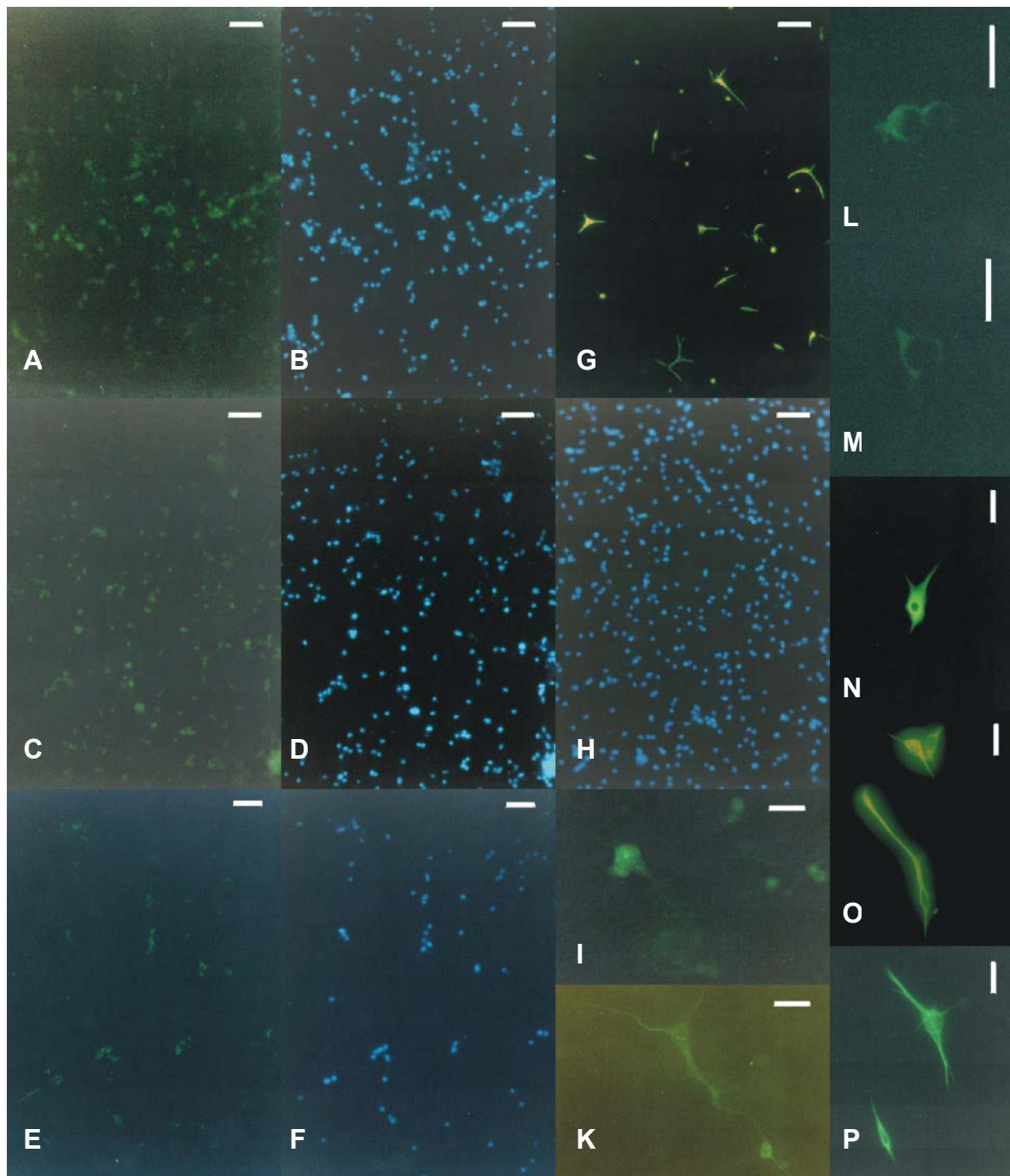


Abb. 17: Immunfärbung für neuronale Marker an durch Linienselektion entstandenen neuronalen Zellen an Tag 30 der Kultur. (A, B) Anti-MAP-2, Balken 26,7  $\mu\text{m}$ . (C, D) Anti-Synaptophysin, Balken 26,7  $\mu\text{m}$ . (E, F) Neurone, die sich positiv mit dem anti-oligodendrozytenspezifischen Protein anfärben lassen, Balken 23,9  $\mu\text{m}$ . (G, H) Anti- GFAP, Balken 26,7  $\mu\text{m}$ . (B), (D), (F) und (H) entsprechen dem gleichen Bildausschnitt wie (A), (C), (E) und (G), Kernfärbung mit bis-Benzimid. (I – L). Vergrößerte Darstellungen der spezifischen Färbungen. (I, K) Anti-Synaptophysin, Balken 8,3  $\mu\text{m}$ . (L, M) Anti-oligodendrozytenspezifisches Protein, Balken 8,3  $\mu\text{m}$ . (N-P) Anti-GFAP, (N) Balken 8,3  $\mu\text{m}$ , (O, P) Balken 6,7  $\mu\text{m}$ .

Die Anti-NF Antikörper färbten hauptsächlich die langen dünnen Fortsätze der Zellen an. Der anti-MAP-2 Antikörper dagegen färbte kurze dicke Zellfortsätze und Zellkörper (Abb. 17 A, B). Die Synaptophysin positive Immunfärbung konnte als granulöses Muster identifiziert werden (Abb. 17

C, D, I, K). Sie zeigten unterschiedliche Größen und finden sich normalerweise im Perikarium neuronaler Zellen und den apikalen Dendriten pyramidalen Zellen.

Die sich entwickelnden Oligodendrozyten konnten an Tag 30 der Kultur an ihrem typischen ovalen Zellsoma mit einem schmalen Rand aus Zytoplasma und einen zentral lokalisierten großen Nucleus identifiziert werden (Abb. 17 E, F, L, M). Ihr Anteil machte etwa 10-20% der gesamten Zellen aus. Ein etwa gleicher Anteil der Zellen exprimierte den astrozytenspezifischen Marker GFAP (Abb. 17 G, H, N-P).

#### **4.3.3.2 Kinetische Analyse der Expression neuronaler und entwicklungsspezifischer Gene während der Selektion der neuronalen Linie**

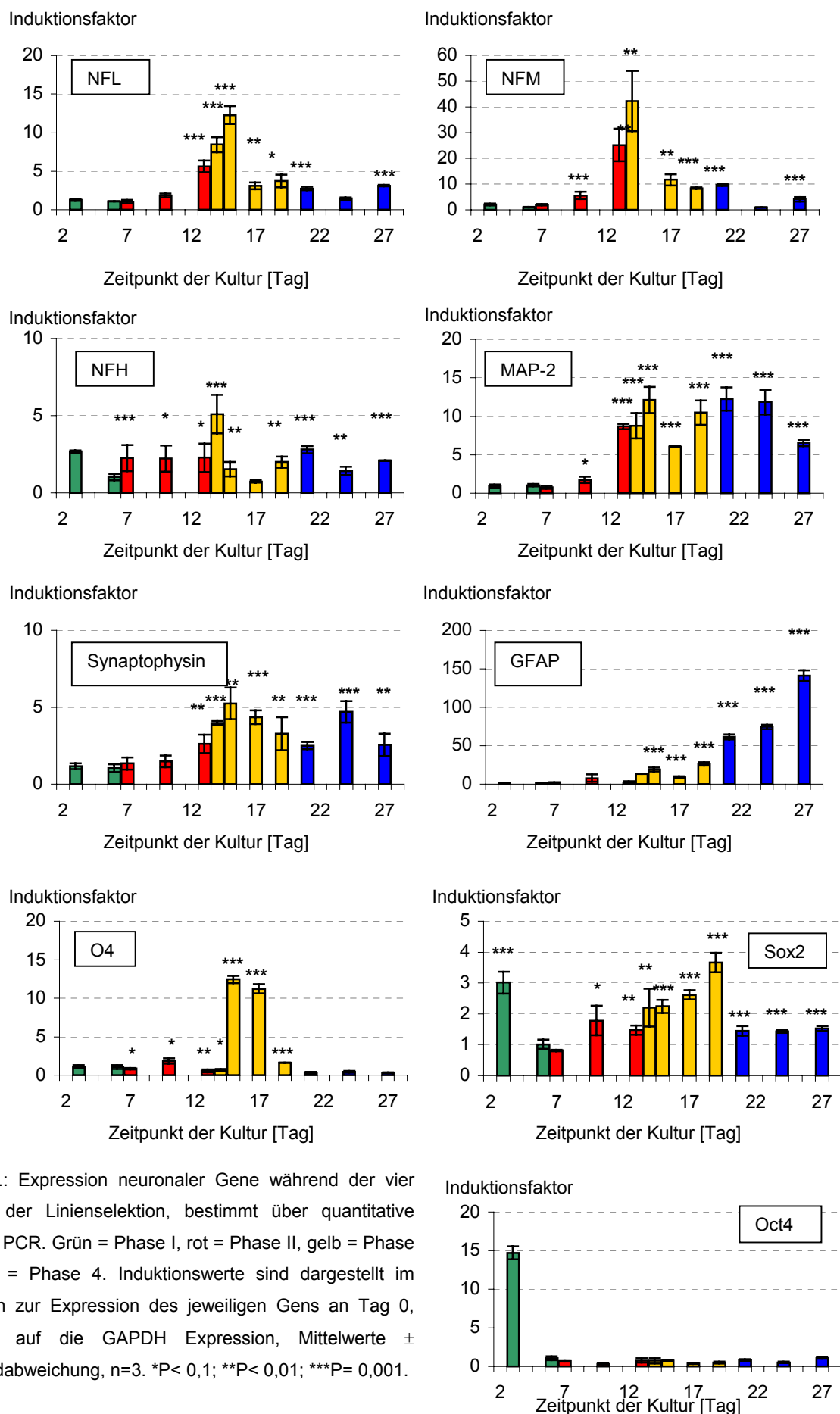
Das Ausmaß der neuronalen Differenzierung während der vier Phasen des Selektionsprotokolls sollte über den gesamten Kulturzeitraum verfolgt werden, um einen Vergleich zwischen den Hauptexpressionszeiten der Markergene unter Retinolsäurebehandlung oder Linienselektion ziehen zu können.

Während der ersten Phase des Protokolls, d.h. während der Ausbildung der EBs und ihrem primären Anheften auf den Kulturplatten an Tag 6 war die Expression der terminalen neuronalen Marker noch nicht induziert. Ab Tag 7, zu Beginn der zweiten Phase, erhielten die Zellen selektives nervenspezifisches ITSFn Medium und das Serum wurde ihnen entzogen. Bereits an Tag 10 waren die Expressionsspiegel der Neuronenmarker NFL, NFM, NFH, MAP-2 und Synaptophysin signifikant gegenüber den Ausgangswerten an Tag 0 der Kultur erhöht, ein Zeichen, dass das spezielle Medium tatsächlich in der Lage ist, die neuronale Differenzierung zu induzieren. An Tag 14 werden die Zellaggregate mit den neuronalen Netzwerken, die sich bis dahin gebildet haben, durch die Dissoziation der Zellen auseinander gerissen. Die Expression der bisher beschriebenen Gene sank deshalb zu Beginn der dritten Phase etwas verzögert an Tag 17 im Vergleich zum Expressionslevel an Tag 14, da die Zellen sich während der Trypsinierung z.B. abrunden und Synapsen zerstört werden. Die Expression der Neurofilamente sank zur vierten Phase der Kultur ab, die Expressionsniveaus von MAP-2 und Synaptophysin wurden aber auf dem ungefähren Stand ihrer Maximalexpression an Tag 14 aufrecht erhalten.

Gliazellen bildeten sich offenbar erst in den letzten beiden Phasen der Kultur. Marker für Oligodendrozyten wurden in der dritten Woche der Kultur maximal exprimiert. Ihre Expression stieg gegenüber dem Ausgangswert um das 10 bis 13-fache. Erst zu einem sehr späten Zeitpunkt in der letzten Phase der Kultur nach Entzug des bFGF wurden Astrozyten ausgebildet, da zu diesem Zeitpunkt erst die Expression des Astrozytenmarkers GFAP stark anstieg. An Tag 27 der Kultur wurden Expressionspiegel erreicht, die den Wert von Tag 0 um das 160-fache übertrafen.

Der neuronale Transkriptionsfaktor Sox2, *in vivo* schon in neuronalen Vorläuferzellen vorhanden, wurde im Gegensatz zu den terminalen Markergenen schon in den sehr frühen Tagen der EB Entwicklung verstärkt exprimiert. An Tag 3 der Kultur wurden etwa 3-fach erhöhte Werte gefunden.







Der GFAP Expression in der vierten Phase vorausgehend, fand Sox 2 allerdings eine zweite Hauptexpressionsphase in der dritten Phase der Kultur, in der die neuronalen Vorläuferzellen stark proliferieren. Die Expression des Pluripotenzmarkers Oct4 sank wie für die allgemeine Differenzierung der ES Zellen gezeigt (4.1.), auf minimale Bruchteile des Ausgangswertes ab.

Die Hauptexpressionszeiten der Neuronenmarker lägen demnach bei Tag 14, Oligodendrozytenmarker wurden an Tag 15-17 maximal exprimiert, der Astrozytenmarker folgte als letztes an Tag 27.

Im Gegensatz zum Retinolsäureprotokoll, bei dem die Hauptexpressionszeit der neuronalen Marker bei Tag 11 liegt, wurden die neuronalen Marker drei Tage später exprimiert, was im Hinblick auf das embryotoxische Potential der Retinolsäure kein großer Nachteil des beschriebenen Selektionsprotokolls wäre.

#### **4.4 Entwicklung skelettaler Elemente in Embryoid Bodies**

Zur Erweiterung des klassischen ESTs wurden Protokolle zur Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten aus embryonalen Stammzellen entwickelt, um die Organe Knochen und Knorpel als neue Endpunkte mit in den zu entwickelnden Stammzelltest einbeziehen zu können. Im Gegensatz zur Kardiomyozyten- und neuronalen Differenzierung, wo bestehende Protokolle auf ihre Eignung für den EST getestet wurden, mussten hier gänzlich neue Entwicklungslinien zur Differenzierung gebracht werden.

Zu diesem Zweck wurde der Einfluss bekannter Supplemente und Wachstumsfaktoren, die bei primär isolierten Osteoblasten und Chondrozyten oder bei Differenzierung dieser Zelltypen aus mesodermalen Stammzellen dem Medium zugesetzt werden, untersucht. Die zeitliche Gabe der Supplemente richtete sich dabei nach den verschiedenen Phasen der ES Zellkultur a) während der Phase der „hängenden Tropfen“ (Tag 1-3), b) zum Zeitpunkt der Suspensionskultur (Tag 3-5), c) zu beiden Phasen (Tag 1-5), d) ab dem Zeitpunkt des Ausbringens auf 24-Loch Platten (Tag 5-~), e) ab der Suspensionskultur (Tag 3-~) und f) über die gesamte Kulturdauer (Tag 1-~), wobei ~ die jeweilige Kulturdauer angab.

##### **4.4.1 Osteogenese**

Zur Entwicklung des Protokolls zur Osteoblastendifferenzierung wurde der Einfluss von  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure, 1,25-OH Vitamin D<sub>3</sub> und BMP-2 auf die ES Zellkultur in Anlehnung an die verschiedenen Kulturphasen untersucht.

#### 4.4.1.1 Charakterisierung von Osteoblasten in Embryoid Bodies

Die Embryonalen Stammzellen wurden während der Kultur zu den angegebenen Zeiten mit a)  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure und b)  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $\text{VD}_3$  supplementiert (Tag 1-3, Tag 1-5, Tag 3-5, Tag 1-~, Tag 3-~ und Tag 5-~, wobei ~ (unendlich) das Ende der Kulturdauer bedeutet). Der Vergleich der Morphologie der mit zusätzlichem  $\text{VD}_3$  supplementierten Kulturen zu Kontrollen im Durchlichtmikroskop zeigte, dass die Medienadditive für die Ausbildung und Mineralisierung einer extrazellulären Matrix unerlässlich sind. Unter Supplementzusatz bildeten sich distinkte akkumulierte Kolonien, eingeschlossen von einer mineralisierten extrazellulären Matrix, die als schwarzer äußerer Ring die Zellen umgab (Abb. 19A).

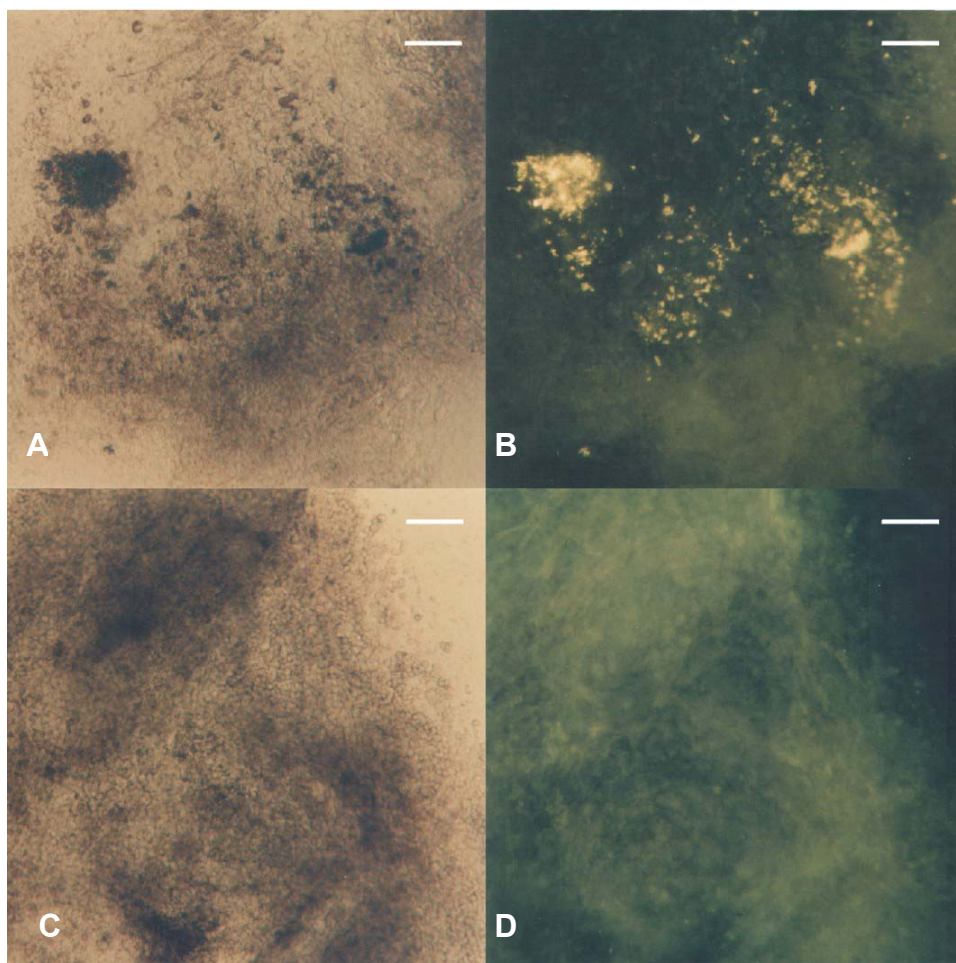


Abb. 19.: (A) Induktion der Mineralisierung durch  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und 1,25-OH Vitamin  $\text{D}_3$ . Dunkel erscheinende Zellen sind umgeben von einer mineralisierten Matrix. (B) Inkorporation von Tetrazyklin in mineralisierte Zellen. Die Autofluoreszenz des Tetrazyklin wurde an Tag 25 der ES Differenzierung im Mikroskop detektiert (Anregungswellenlänge 340 nm/ Emissionswellenlänge 550 nm). (C, D). Keine mineralisierten bzw. fluoreszierenden Zellen konnten in Kontrollkulturen beobachtet werden. Das Medium enthielt für supplementierte und Kontrollkulturen 35  $\mu\text{g/ml}$  Tetrazyklin ab Tag 5 der Kultur. Balken = 42  $\mu\text{m}$ .

Wurden die Zellen während der ersten 5 Tage (d 1-3, d 1-5, d 3-5) mit den Additiven supplementiert, kam es nicht zu einer Ausbildung dieser schwärzlichen Zellen und somit nicht zu einer Kalzifizierung. Nur die EBs, die mit den Additiven bis zum letzten Tag der Kultur supplementiert wurden (d 1-~, d 3-~ und d 5-~) zeigten eine derartige Morphologie. Zu einer vermehrten Entwicklung schwarz erscheinender Zellen kam es obendrein unter zusätzlicher Addition von  $\text{VD}_3$  zum Kulturmedium. Die Behandlung der Kulturen ab Tag 5 resultierte in einer massiv gesteigerten Anzahl der schwärzlichen Zellen (optische Schätzung).

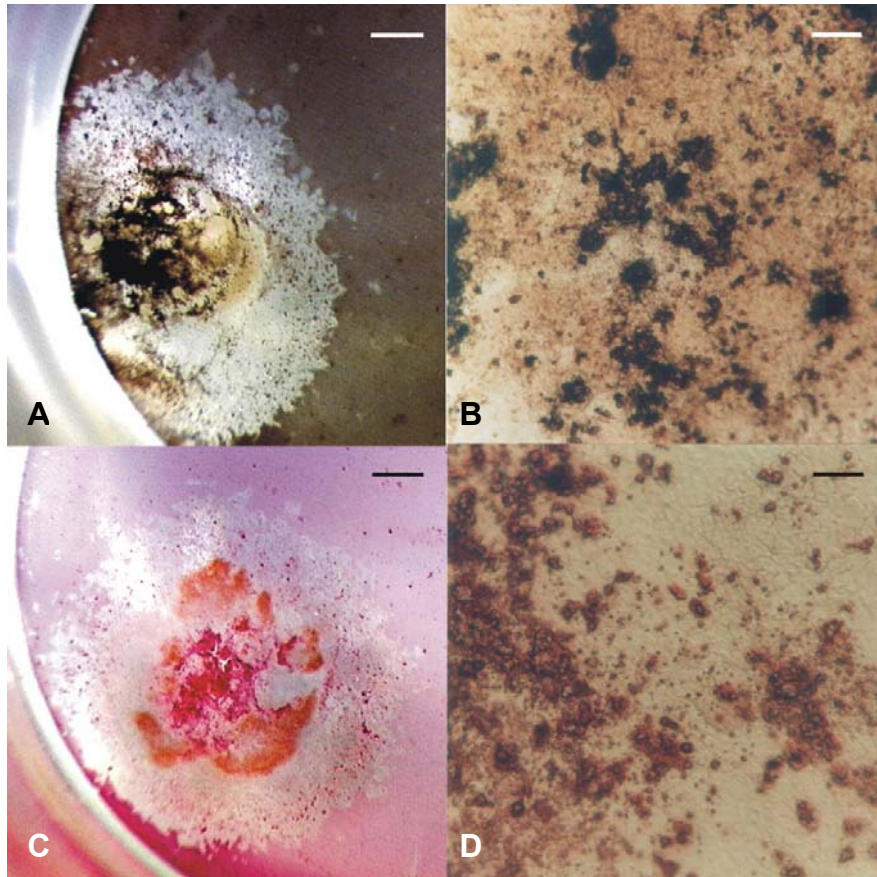


Abb. 20.: Histochemische Detektion von Kalzium- und Phosphatmineralien in Embryoid Bodies an Tag 30 der Kultur. EBs wurden ab Tag 5 mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $1,25\text{-OH}$  Vitamin  $\text{D}_3$  supplementiert. (A, B) von Kossa Färbung. (C, D) Alizarinrot S Färbung. Balken =  $160\mu\text{m}$  (A, C) bzw.  $27\mu\text{m}$  (B, D).

Die Matrixproduktion begann fünf bis sechs Tage nach ihrer Induktion an Tag 5 und steigerte sich im Laufe der Kulturphase markant. Die Mineralisierung der Matrix konnte über die Einlagerung von Tetrazyklin nachgewiesen werden (Abb. 19B) Dieses Antibiotikum hat die Eigenschaft, sich in mineralisierte Bereiche einzubinden. Durch seine Autofluoreszenz ist das Tetrazyklin leicht unter UV-Licht zu detektieren. An Tag 30 der Kultur waren konträr zu den Kontrollen einzig in den supplementierten EBs fluoreszierende, also mit Tetrazyklin markierte Bereiche zu beobachten (Abb. 19 B und D). Im Durchlicht betrachtet zeigt der gleiche Bildausschnitt deutlich, dass es sich



bei den angefärbten Zellen korrelierend mit der früheren Beobachtung um die schwärzlichen Zellen handelt.

Histochemische Methoden wie von Kossa und Alizarinrot S Färbungen (Abb. 20) verdeutlichten zusätzlich die Deposition von Kalzium- und Phosphatmineralien innerhalb der mineralisierten Matrix. Die von Kossa Methode färbt mineralisierte Zellen bräunlich bis schwarz, unter der Alizarinrot S Färbung erscheinen die mineralisierten Zellen rötlich.

Annähernd die Hälfte aller Zellen im EB wurde durch die Färbemethoden als mineralisiert identifiziert. Die spezifische histochemische Färbung ist eindeutig auf die mit einer schwärzlichen erscheinenden Matrix umgebenen Zellen beschränkt. Die Anzahl der Knochenagglomerate variierte mit der Art der Kulturbedingungen. Sie stieg deutlich unter der Gabe von zusätzlichem  $VD_3$  ab Tag 5 der Kultur.

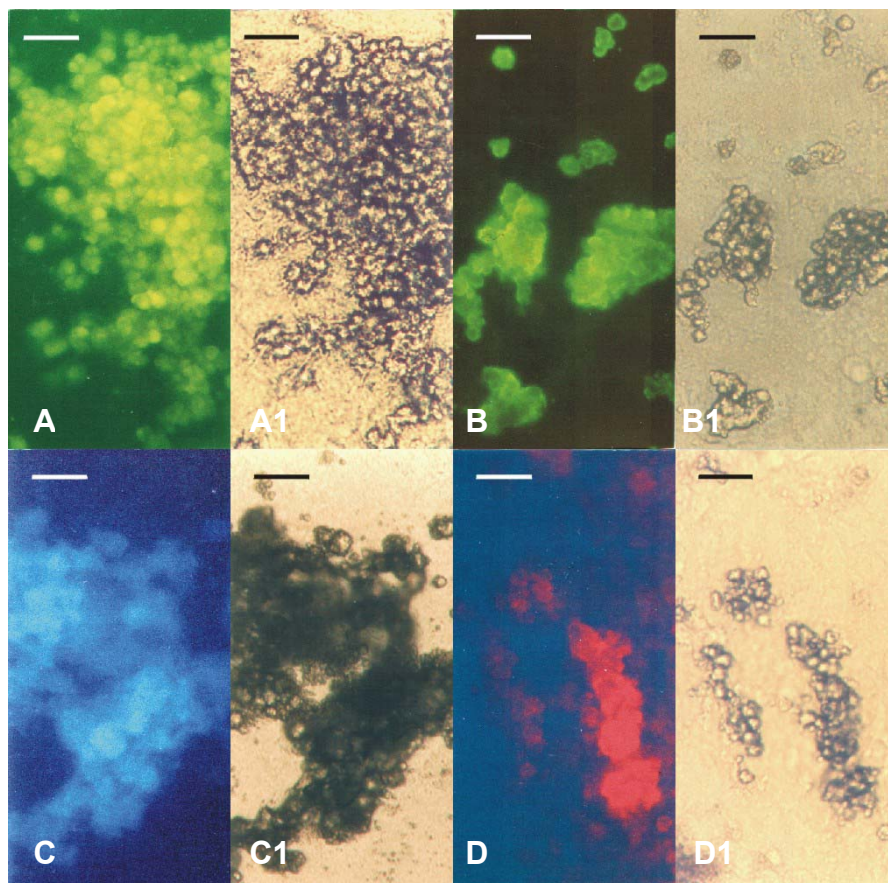


Abb. 21.: Detektion nicht-kollagener knochenspezifischer Proteine mittels Immunfluoreszenz. Embryoid Bodies wurden ab Tag 5 mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und 1,25-OH Vitamin  $D_3$  supplementiert. (A) FITC-konjugierter Antikörper gebunden an den polyklonalen anti-Osteocalcin Antikörper. (B) Detektion des primären monoklonalen Antikörpers anti-Osteopontin mit Alexa Fluor 350. (C) Detektion des primären polyklonalen anti-Osteonectin mit Alexa Fluor 488. (D) Reaktion des polyklonalen Antikörpers gegen Bone Sialoprotein mit dem Alexa Fluor 546 konjugierten zweiten Antikörper. Die Zellen, die von den Antikörpern detektiert werden, korrespondieren mit den rundlichen Zellen, die von einer schwarzen Matrix umgeben sind, wie auf den entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen zu sehen (A1-D1). Balken = 8,3  $\mu m$ .

Immunzytochemische Färbungen der mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $\text{VD}_3$  supplementierten Embryoid Bodies dokumentierten die Existenz der vier nicht-kollagenen knochenspezifischen Proteine Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin und Bone Sialoprotein (Abb. 21 A-D). Osteocalcin, ein Protein, dass spezifisch nur von reifen adulten Osteoblasten synthetisiert wird, wird von den rundlichen mineralisierten Zellen produziert (Abb. 21A), die mit der von Kossa und Alizarinrot S Färbung als mineralisierte Zellen identifiziert wurden. Die gleiche Art der rundlichen Zellen wurde spezifisch von den Antikörpern gegen Osteopontin (Abb. 21B), Osteonectin (Abb. 21C) und Bone Sialoprotein (Abb. 21D) detektiert, was zeigt, dass alle vier Proteine in mineralisierten Zellen exprimiert werden. Abbildung 21 bestätigt, dass die Markierung mit den Antikörpern spezifisch ist, und, dass die Färbung auf diejenigen Zellen beschränkt ist, die zuvor über von Kossa und Alizarinrot S Färbung als mineralisiert identifiziert wurden. Diffuse intrazelluläre zytoplasmische Färbung konnte generell mit den Antikörpern gegen Osteocalcin und gegen Osteonectin beobachtet werden, während die Markierung mit den Antikörpern gegen Osteopontin und Bone Sialoprotein an der äußeren Membran der Zellen lokalisiert zu sein schien.

#### 4.4.1.2 Identifizierung von Markergenen für Knochengewebe

Die Expression der in der Literatur beschriebenen im Knochengewebe exprimierten Gene Bone Sialoprotein, Osteocalcin, ALP, Kollagen Typ I, Cbfa1, Osteopontin und Osteonectin mittels RT-PCR auf cDNA von Organen erwachsener Mäuse, genomischer DNA und cDNA muriner Embryonen (Tag 12,5 p.c.) untersucht, um geeignete knochenspezifische Markergene zu bestimmen. Zur Gewinnung der cDNA wurden die entsprechenden Gewebe nach 3.1. entnommen und die totale RNA isoliert (3.4.1.). Die erhaltene RNA wurde quantifiziert und in einer cDNA Synthese eingesetzt (3.4.3., 3.4.5.).

Das Bone Sialoprotein war primär in Osteoblasten lokalisiert (Abb. 22, Pfeil), könnte daher als Markergen geeignet sein. In den anderen ausgewählten Organen fand sich kein Signal. Auch Osteocalcin wurde als ein osteoblastenspezifischer Marker identifiziert, denn auch seine Expression ist auf Knochengewebe limitiert. Sowohl Osteocalcin wie auch Bone Sialoprotein wurden auch in 12,5 Tage alten Embryos exprimiert. Osteocalcin wurde auch von undifferenzierten ES Zellen exprimiert, Bone Sialoprotein dagegen nicht.

ALP, Kollagen Typ I und Osteonectin wiesen zwar die höchste Expression in Knochen auf, wie an der stärksten exprimierten Bande zu sehen, waren aber, wenn auch in geringeren Spiegeln, in anderen Organen vertreten wie Knorpel oder Lunge. Kollagen Typ I Transkripte fanden sich in fast jedem Organ mit Ausnahme der Leber. Osteopontin konnte in den verschiedensten Geweben nachgewiesen werden, mit der deutlichsten Expression in Nierenzellen.

Die Cbfa1 Expression trat bevorzugt in Osteoblasten auf, ein geringes Signal fand sich aber auch in der Lunge.

Alle untersuchten Primerpaare generierten ihr spezifisches Transkript auf den verschiedenen cDNAs in der gleichen Größe wie auch mit genomischer DNA. Einzig die Primer für Kollagen Typ I umspannen ein Intron, so dass das von ihnen generierte Transkript auf genomischer DNA entsprechend größer war und deshalb nicht im Bildausschnitt erscheint.

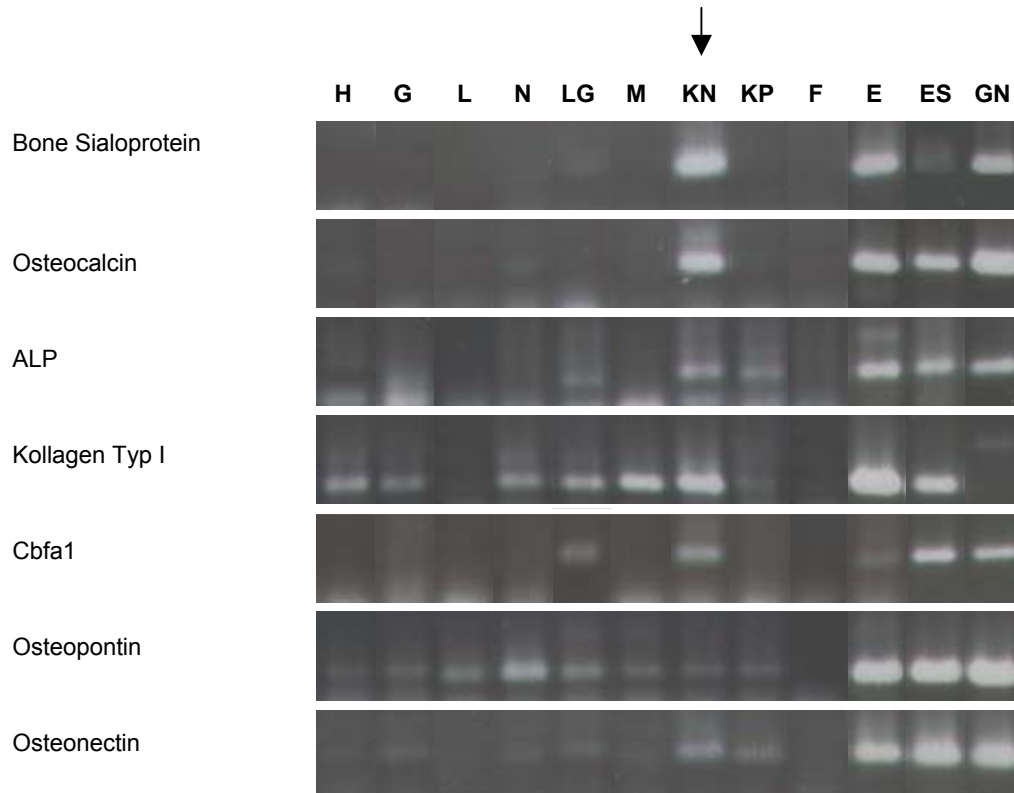


Abb. 22.: Nachweis der verschiedenen in der Literatur beschriebenen Knochentranskripte über RT-PCR in verschiedenen Geweben. Die verschiedenen Bahnen zeigen die entsprechenden Gewebe wie angegeben. H = Herz, G = Gehirn, L = Leber, N = Niere, LG = Lunge, M = Muskel, KN = Knochen (Pfeil), KP = Knorpel, F = Fettgewebe, E = Embryo 12,5 p.c., ES = undifferenzierte ES Zellen + LIF, GN = genomische DNA.

#### 4.4.1.3 Einfluss von Medienzusätzen auf die Expression osteoblasten- und entwicklungsspezifischer Gene

##### 4.4.1.3.1 Abhängigkeit der Genexpression von Zeitpunkt und Dauer der Supplementapplikation

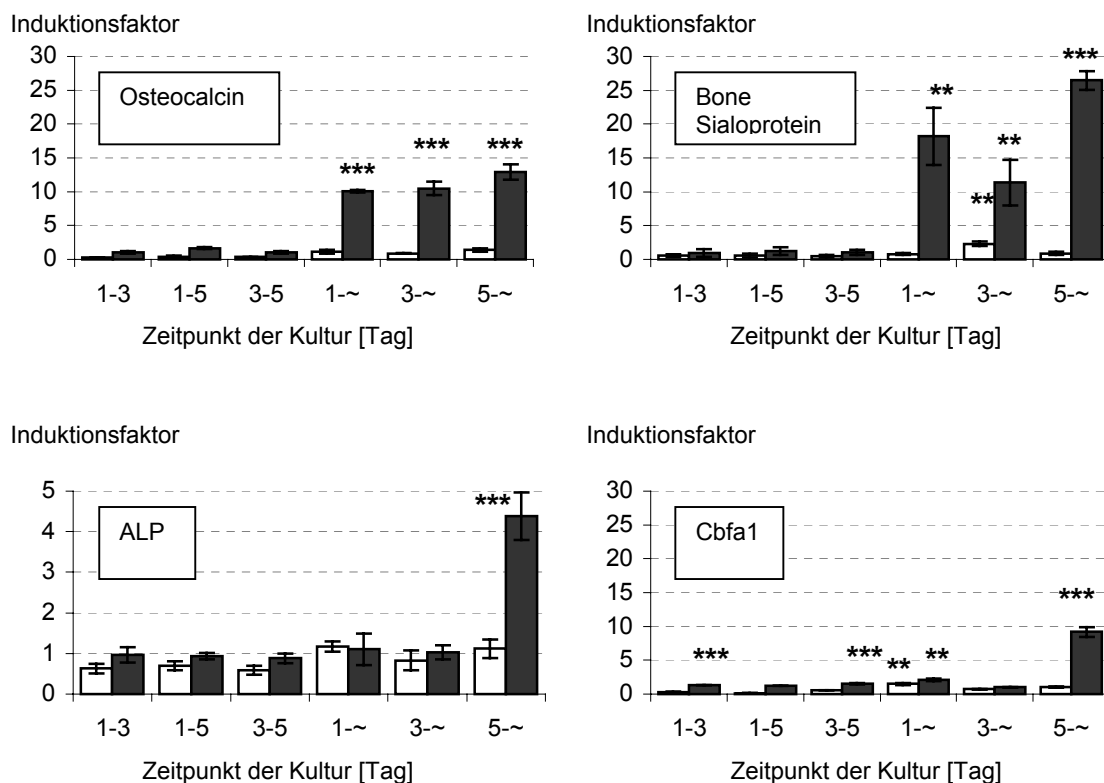
Unter Verwendung der quantitativen TaqMan PCR Analyse wurde die Varianz der RNA Expressionwerte in Gegenwart von 1,25-OH Vitamin D<sub>3</sub> gemessen (Abb. 23). Die EBs wurden mit a)  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure und b)  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und zusätzlichem 1,25-OH Vitamin D<sub>3</sub> zu den entsprechenden Kulturzeiten supplementiert (Tag 1-3, Tag 1-5, Tag 3-5, Tag 1-~, Tag 3-~ und Tag 5-~). Gesamt RNA wurde an Tag 30 extrahiert (3.4.1.), in cDNA umgeschrieben (3.4.5.) und einer TaqMan PCR Analyse unterzogen (3.4.7.).

Die Osteocalcinexpression war signifikant bei Supplementation des Mediums mit Vitamin D<sub>3</sub> bis zum Ende der Kultur ( $P=0,001$ ) induziert. Eine etwa 10-fache Erhöhung fand sich bei Behandlung der EBs ab Tag 1 und Tag 3. Die Gabe des 1,25-OH Vitamin D<sub>3</sub> ab Tag 5 der Kultur führte zu einer 13-fachen Steigerung der Osteocalcinexpression. VD<sub>3</sub> verursachte bei der Expression des Bone Sialoprotein Induktionsraten, die diejenigen des Osteocalcins noch übertrafen.

Die Bone Sialoprotein Expression erreicht bei Supplementation mit 1,25-OH Vitamin D<sub>3</sub> ab Tag 1 und Tag 3 ein Niveau, das 18-fach bzw. 10-fach über dem der Kontrolle lag ( $P<0,01$ ). Der signifikanteste Anstieg war bei Gabe ab Tag 5 zu verzeichnen (Faktor 26,  $P=0,001$ ).

Die Größenordnung der Antwort hing eindeutig von der Dauer und dem Zeitpunkt der VD<sub>3</sub> Exposition ab, da bei Gabe an den ersten fünf Kulturtagen (Tag 1-3, Tag 1-5, Tag 3-5) kein Anstieg der Expression beider Markergene verzeichnet werden konnte. Die Expressionswerte, die mit Induktion von  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure alleine erreicht wurden, lagen bei allen Supplementationsperioden im Bereich der Kontrolle oder sogar darunter. Erst bei Gabe während der gesamten Kulturperiode war eine signifikante Induktion zu verzeichnen. Die signifikanteste Steigerung erfolgte hier bei additiver Gabe von  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und VD<sub>3</sub> ab Tag 5 der Kultur.

Im Gegensatz zu Osteocalcin und Bone Sialoprotein war die ALP Expression nur bei Gabe des VD<sub>3</sub> ab Tag 5 der Kultur signifikant induziert. Hier wurden Induktionsfaktoren von 4,5 gegenüber der Kontrolle verzeichnet ( $P=0,001$ ).



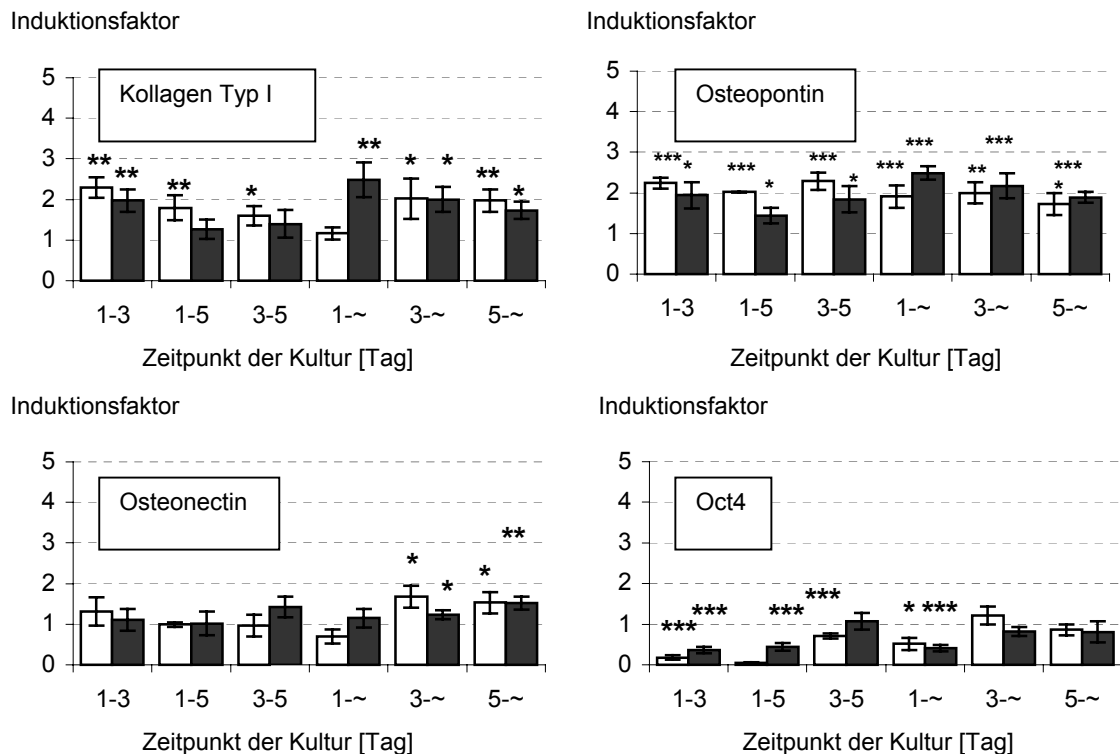


Abb. 23.: Effekt von VD<sub>3</sub> auf die Expression verschiedener in Knochengewebe exprimierter Gene, ermittelt mit quantitativer TaqMan PCR. Behandlung mit β-Glycerolphosphat und Ascorbinsäure oder β-Glycerolphosphat, Ascorbinsäure und zusätzlichem 1,25-OH Vitamin D<sub>3</sub> erfolgte zu den entsprechenden Kulturzeiten wie angegeben. Embryoid Bodies wurden an Tag 30 der Kultur lysiert. Die Ergebnisse zeigen den Induktionsfaktor der Expression normiert auf die GAPDH Expression im Vergleich zur Kontrolle, die als 1 gesetzt wurde (Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 3 unabhängige Experimente, jeweils 20 EBs). \*P < 0,1; \*\*P < 0,01; \*\*\*P = 0,001. □ + β-Glycerolphosphat + Ascorbinsäure ■ + β-Glycerolphosphat + Ascorbinsäure + VD<sub>3</sub>.

Die Expression des Cbfa1 Gens, das für den osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktor Osf2 kodiert, lag in den nur mit β-Glycerolphosphat und Ascorbinsäure an Tag 1-3, Tag 1-5 und Tag 3-5 supplementierten EBs signifikant unter den Basiswerten der Kontrolle (P = 0,001). Der zusätzliche Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> gegeben zu den gleichen Zeitpunkten ließ die Cbfa1 Expression signifikant ansteigen (P = 0,001). Ebenfalls ab Tag 5 über die gesamte Dauer der Kultur gegeben erhöhte VD<sub>3</sub> die Cbfa1 Expression signifikant auf das 9-fache im Vergleich zur Kontrolle (P = 0,001).

Im Vergleich zu den deutlich hochregulierten Genen Osteocalcin, Bone Sialoprotein und ALP, lagen die Expressionen des Osteopontin und des Kollagen Typ I Gens etwa beim 1,5 bis 2,3-fachen der Kontrolle, die Expression des Osteonectingens lag etwa im Bereich der Kontrolle.

Diese Daten können bedeuten, dass a) die Expression dieser Gene sich nicht eindeutig gegenüber der Kontrolle erhöht war oder b) die Expression dieser Gene nicht an Tag 30, wie untersucht, sondern zu einem anderen Zeitpunkt induziert wurde. Osteopontin, Kollagen Typ I und Osteonectin werden auch in anderen Geweben außer Knochen, also von mehreren Zelltypen, exprimiert, wie unter 4.4.1.2. gezeigt. Deshalb ist es nicht verwunderlich, wenn auch in den Kontrollen ein



gewisser Expressionsspiegel dieser Gene aufrecht erhalten wird und so keine eindeutige Induktion dieser Gene ermittelt werden konnte. Unter Zugabe von  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure  $\pm$  Vitamin D<sub>3</sub> war die Expression des Oct4 im Vergleich zur Kontrolle abgesenkt. In den 30 Tage alten supplementierten EBs befanden sich also weniger undifferenzierte pluripotente Zellen als in den Kontrollen, ein Zeichen für die allgemeine Differenzierung der Zellen verbunden mit dem Verlust der Pluripotenz. Der Unterschied zur Kontrolle könnte daher rühren, dass zu diesem späten Zeitpunkt der Kultur weniger undifferenzierte Zellen im EB vorhanden sind als wenn die Zellen spontan differenzieren, da durch die Induktionsfaktoren die Differenzierung erzwungen wird.

#### 4.4.1.3.2 Einfluss von VD<sub>3</sub> auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP)

Eine hohe alkalische Phosphataseaktivität des knochenspezifischen Isotyps ist ein etablierter Marker des osteoblastischen Phänotyps und wurde daher benutzt, um zu untersuchen, in wie fern  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und 1,25-OH Vitamin D<sub>3</sub> den Mineralisierungsprozess beeinflussen. Embryoid Bodies wurden unter dem Einfluss von  $\beta$ GP und Ascorbinsäure mit oder ohne VD<sub>3</sub> in verschiedenen experimentellen Ansätzen kultiviert (Behandlungszeiten wie unter 4.4.1.3.1. beschrieben) und an Tag 30 der Kultur nach 3.8 die Aktivität der von ihnen exprimierten ALP gemessen (Abb. 24). Ascorbinsäure wird für die Deposition des Kollagens in die extrazelluläre Matrix benötigt und induziert auch die ALP.  $\beta$ -Glycerophosphat zeigte synergistische Funktion mit der Ascorbinsäure und ist unerlässlich während der Mineralisierungsprozesse reifer Kulturen.

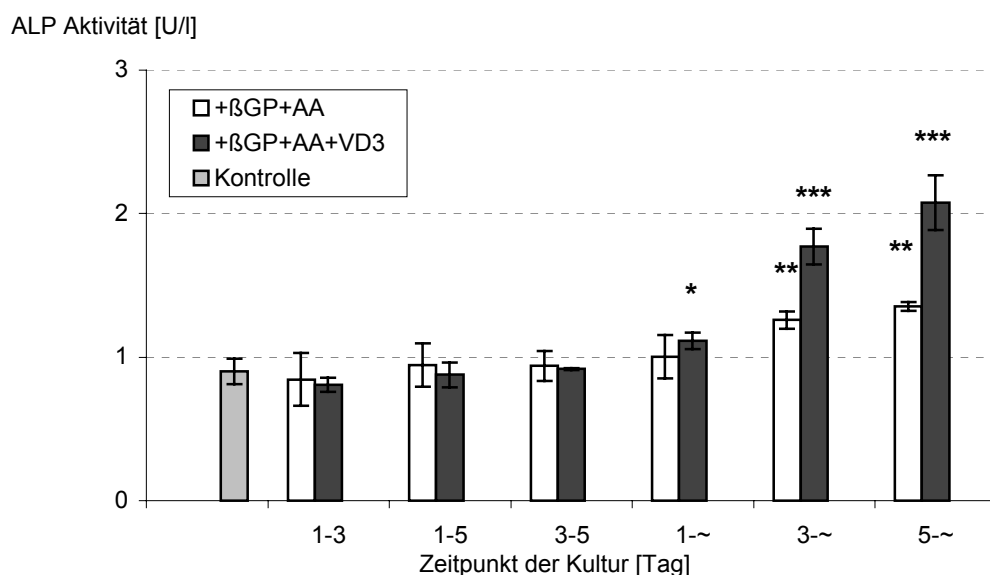


Abb. 24: Abhängigkeit der Aktivität der alkalischen Phosphatase von Vitamin D<sub>3</sub>. EBs wurden zu den angegebenen Zeiten mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure mit oder ohne zusätzlichem VD<sub>3</sub> supplementiert (~= Ende des Experimentes, hier Tag 30). 8 EBs pro Versuchsgruppe wurden auf ihre ALP Aktivität hin untersucht. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung sind für Triplet-Experimente gezeigt. \*P< 0,1; \*\*P< 0,01, \*\*\*P= 0,001, bezogen auf die Kontrollen.

Ähnlich der Expression des Bone Sialoprotein Gens und Osteocalcingens (4.4.1.3.1.) konnte ein induzierender Effekt der Zusätze auf die ALP Aktivität nicht beobachtet werden, wenn sie nur während der ersten fünf Tagen der ES Kultur gegeben wurden. Die ALP Aktivität wurde nur bei Gabe der entsprechenden Supplemente signifikant erhöht, wenn sie über die gesamte Zeitspanne der Kultur bis Tag 30 appliziert wurden. Behandlung der Zellen mit  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure alleine von Tag 5 an, produzierte einen 1,6-fachen Anstieg der ALP Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.

Der steigernde Effekt des  $VD_3$  wurde statistisch relevant bei Zugabe von Tag 3 oder Tag 5 an bis zum Experimentende an Tag 30. Der Anstieg der Enzymaktivität wurde nach Behandlung mit zusätzlichem  $VD_3$  auf das 2,3-fache verstärkt.

Um der Frage nachzugehen, wie die Aktivität der alkalischen Phosphatase über die gesamte Kulturdauer reguliert wird, wurden die EBs an Tag 5 auf 24-Loch Zellkulturplatten aufgebracht und bis Tag 35 mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$  supplementiert. Kontrollplatten wurden ohne die entsprechenden Zusätze kultiviert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die Aktivität der ALP bestimmt (3.8.).

ALP Aktivität [U/l]

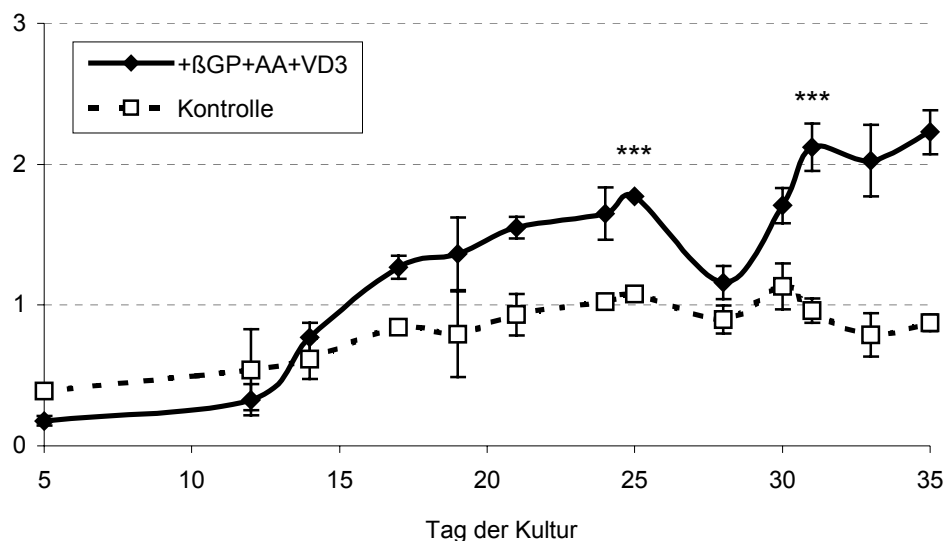


Abb. 25: Aktivität der alkalischen Phosphatase im Verlauf der 35 Tage dauernden Embryoid Body Differenzierung. Vergleich zwischen Kontrollkulturen und mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$  ab Tag 5 supplementierten Kulturen. Die ALP Aktivität ist gezeigt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für 3 unabhängige Experimente. \*\*\*P= 0,001, bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert.

In Abwesenheit der Induktoren behalten die EBs einen Basalspiegel bei, der sich etwa fünf Tage nach Beginn der Supplementation leicht erhöhte (Abb. 25). Die ALP zeigte von Tag 5 bis 12 eine minimal höhere Aktivität in den Kontrollen als in den supplementierten EBs, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Etwa an Tag 14 stieg der ALP Spiegel der supplementierten EBs über den der Kontrolle an. Die alkalische Phosphatase schien in den supplementierten Kulturen in zwei

Phasen induziert zu werden, da zwei Hauptaktivitätszeiten entdeckt werden konnten. Zu den Tagen 20-25 war die ALP 1,75-fach über der Kontrolle induziert ( $P=0,001$ ), im zweiten Zeitabschnitt zu den Tagen 30-35 dagegen 2,2-fach ( $P=0,001$ ).

#### 4.4.1.3.3 Kinetische Analyse der knochenspezifischen Genexpression während der EB Differenzierung

Die bisher gezeigten Ergebnisse implizieren, dass die durch  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$  induzierte Differenzierung von Progenitorzellen zum osteoblastischen Phänotyp kein spontaner Prozess ist. Die Zellen brauchten ungefähr eine Woche, um erhöhte ALP Expression und Aktivität zu zeigen und die Anfänge der Mineralisierung traten noch später auf. Offenbar ist ein anhaltendes externes Signal nötig, um den kontinuierlichen Prozess der Expression der knochencharakteristischen Gene in Gang zu halten, die sequentiell in Relation zueinander stehen. Dieses anhaltende Signal war die kontinuierliche Gabe der Medienzusätze  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$  vom fünften Tag der Kultur an.

Ein Anstieg der ALP Aktivität geht der Differenzierung zu Osteoblasten *in vivo* und *in vitro* voraus und ist eindeutig mit dieser assoziiert. Um zu bestimmen, ob der Anstieg der ALP Aktivität sich auch auf der RNA Ebene manifestierte, wurden die ab Tag fünf mit den oben beschriebenen Zusätzen supplementierten EBs zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Gesamt-RNA isoliert (3.4.1.). Nach der Erststrangsynthese (3.4.5.) wurde die korrespondierende cDNA in der quantitativen PCR im TaqMan System eingesetzt (3.4.7.).

Während der 35 Tage dauernden Kultur erreichte die ALP Expression in den supplementierten EBs periodisch dreimal einen Höchststand (Abb. 26). Die ALP Aktivität in den Zellen erhob sich an Tag 12 das erste Mal über den der Kontrolle, sank aber sogleich wieder ab. Der erste echte Anstieg erfolgte in der dritten Woche zwischen Tag 14 und 16 (Faktor 1-2). Der zweite Anstieg folgte an den Tagen 20-22, die maximale Expression konnte beim Übergang in die fünfte Kulturwoche zwischen Tag 27 und 34 beobachtet werden. Im Vergleich stieg die Expression des ALP Gens über die Kulturdauer an, um nach erfolgter Mineralisierung wieder abzufallen.

Neben der ALP wurden die Zellen auch auf die Expression von mRNAs für Kollagen Typ I, Osteopontin, Osteonectin, Cbfa1, Bone Sialoprotein und Osteocalcin hin untersucht (Abb. 26).

Die Expressionsmuster von Kollagen Typ I, Osteonectin und Osteopontin glichen sich in so fern, dass sie sowohl in Kontrollkulturen wie auch supplementierten Kulturen konstant über die gesamte Kulturdauer exprimiert wurden. Dennoch wurden ihre Expressionsspiegel während der osteoblastischen Differenzierung, induziert durch die zugegebenen Supplemente, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen in zwei Intervallen hochreguliert. Zwischen den Tagen 5 und 10 wurden diese drei Gene auch in den Kontrollen hochreguliert, was jedoch mit der gewählten Darstellung hier nicht ersichtlich wird. Die Induktion an diesen Tagen ist also in Wirklichkeit nur die

Beschleunigung eines ohnehin spontan ablaufenden Prozesses. Ab Tag 12 der Kulturzeit beginnt dann der erste signifikante Anstieg in der Expression dieser drei Gene.

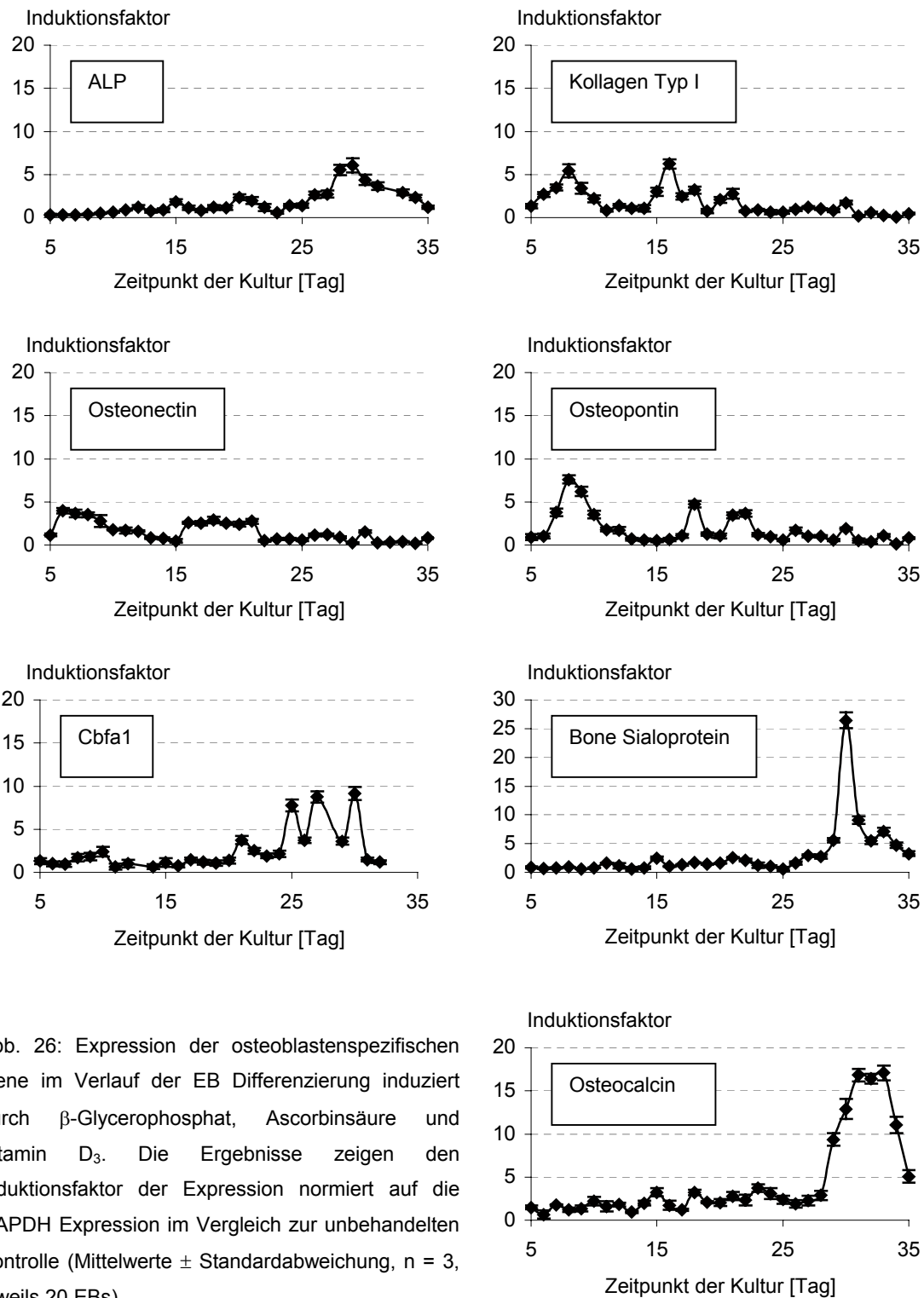


Abb. 26: Expression der osteoblastenspezifischen Gene im Verlauf der EB Differenzierung induziert durch  $\beta$ -Glycerolphosphat, Ascorbinsäure und Vitamin D<sub>3</sub>. Die Ergebnisse zeigen den Induktionsfaktor der Expression normiert auf die GAPDH Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 3, jeweils 20 EBs).

Die erhöhte Kollagen Typ I Expression wurde bis Kulturtag 18 auf einem 5-6-fachen Niveau der Kontrolle gehalten, danach sank sie unter die Kontrollwerte. Eine etwa 3-fache Induktion konnte im Laufe der dritten Kulturwoche an den Tagen 16-22 der Osteonectinexpression zugeschrieben werden. Die Osteopontinexpression dagegen wurde zwischen Tag 18 und 23 hochreguliert.

Der starke Anstieg in der Kollagen Typ I, Osteonectin und Osteopontin Expression zum Ende der dritten Kulturwoche wird von einer geringen Induktion des Cbfa1 Gens auf das 2-fache der Kontrollwerte begleitet. Das Produkt des Cbfa1 Gens, einem regulatorischen Gen der Osteogenese, besitzt Erkennungssequenzen in den Genen für Osteocalcin und Bone Sialoprotein, wo es die Transkription dieser Gene induziert. Beginnend mit der vierten Kulturwoche stieg seine Expression dramatisch an und ging somit der Expression von Bone Sialoprotein einen Tag und der des Osteocalcins drei Tage voraus. Die Ascorbinsäure im Kulturmedium kann die Bindung des Transkriptionsfaktors an seine Erkennungsstelle stabilisieren und induziert somit eine gesteigerte Osteocalcin und Bone Sialoprotein Synthese.

Die Expression von Bone Sialoprotein und Osteocalcin war im Vergleich zu den bisher beschriebenen Genen verspätet. 1,5-2-fach erhöhte Bone Sialoprotein Spiegel konnten schon in der zweiten und dritten Kulturwoche beobachtet werden, der Hauptanstieg wurde aber erst in der vierten Woche ab Tag 24 verzeichnet. Die Bone Sialoprotein Expression fiel nach Tag 31 wieder ab. Auch die Osteocalcinexpression war während der zweiten und dritten Kulturwoche schon 2-3-fach über der Kontrolle erhöht. Beginnend mit Tag 27 wurden erhöhte Osteocalcin Transkriptionsraten in der fünften Kulturwoche über mehrere Tage aufrecht erhalten.

Die Expression von Oct4 wurde im Verlauf der Kultur supprimiert, ein Indikator für die allgemeine terminale Differenzierung der ES Zellen.

#### **4.4.1.4 Veränderung der Osteogenese unter Einfluss von BMP-2**

Wie in den bisher beschriebenen Experimenten gezeigt, war die Anwesenheit der mineralisierenden Faktoren  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$  unbedingt notwendig, um die Expression verschiedener osteoblastenspezifischer Marker zu erreichen. Diese Faktoren schienen aber nur die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen in fertige Osteoblasten zu beeinflussen und für die Mineralisierung dieser Zellen zu sorgen, nicht aber die Prädetermination von mesenchymalen Zellen zu Osteoprogenitoren, einem Prozess der *in vivo* während der frühen Embryonalentwicklung vonstatten geht. Diese sehr frühen Prozesse laufen in Embryoid Bodies während der Suspensionsphase zwischen dem dritten und fünften Kulturtag ab [Yamada et al., 1994; Johansson und Wiles, 1995], bei denen die bisher untersuchten Supplemente keinen Einfluss hatten. Aus diesem Grund sollte geprüft werden, ob andere Faktoren wie etwa das BMP-2 gegeben zwischen Tag 3 und 5 der Kultur die Determination mesenchymaler Stammzellen zu Osteoprogenitoren induzierend unterstützen kann.

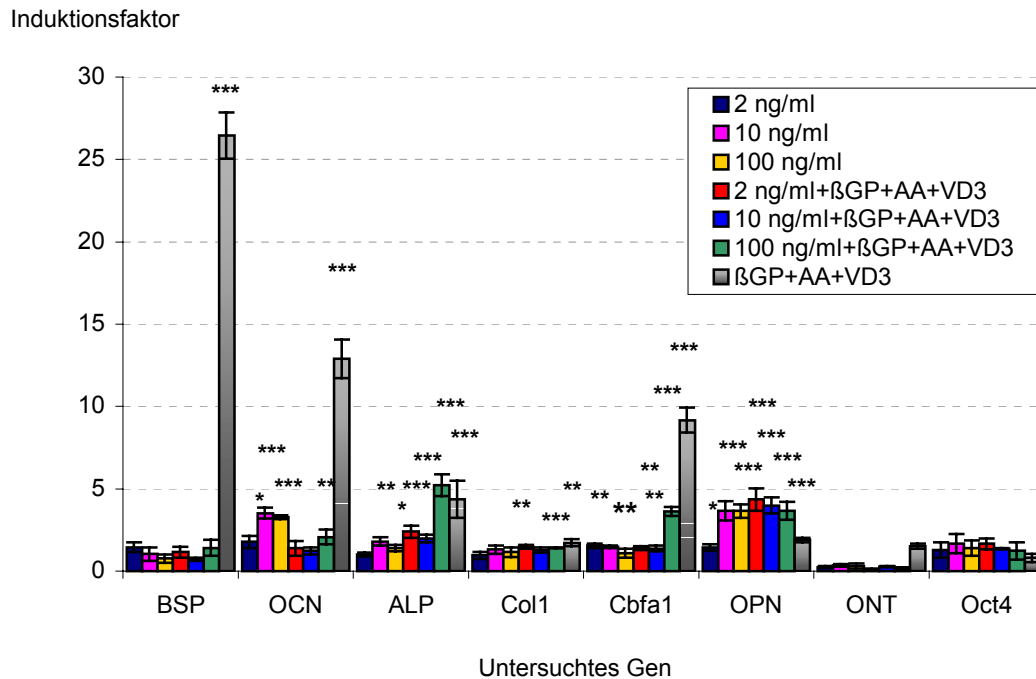


Abb. 27: Abhängigkeit der Expression verschiedener in Knochengewebe exprimierter Gene von BMP-2 und  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$ . Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente wurden über TaqMan PCR Analyse bestimmt und sind auf die GAPDH Expression normiert. Kontrollwerte wurden gleich 1 gesetzt. \* $P < 0,1$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P = 0,001$ .

In seiner Funktion als Osteoinduktor steigerte BMP-2 die Expression der verschiedenen osteoblastenspezifischen Gene von im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 27). Die Expression von Osteocalcin, ALP, Cbfa1 und Osteopontin war an Tag 30 der Kultur unter BMP-2 gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant gesteigert. Die Bone Sialoprotein Expression war nicht verändert. Die Expression des Osteonectin, Kollagen Typ I und Oct4 dagegen verhielt sich nicht anders als die Kontrolle, was wahrscheinlich daran liegt, dass diese Gene in einer früheren Phase der ES Kultur gesteigert exprimiert werden und eine Induktion deshalb zu diesem späten Zeitpunkt an Tag 30 nicht detektiert werden können.

Die Behandlung der Zellen mit BMP-2 an Tag 3-5 und der zusätzlichen Applikation von  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$  ab Tag fünf erhöhte zwar die durch BMP-2 allein induzierten Werte, die von  $VD_3$  allein erzielte Induktion wurde jedoch nicht erreicht. Einzig das Osteopontin Gen schien durch die Behandlung mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure,  $VD_3$  und BMP-2 additiv induziert zu werden.

Tabelle 1 zeigt die Änderung der Expression im Vergleich zur Kontrolle und den mit jeweils nur einem Additiv supplementierten Kulturen im Detail.

BMP-2 steigert demnach die Expression von osteoblastenspezifischen Genen im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Gegenüber der Induktion mit den entsprechenden Knocheninduktionssubstanzen reguliert BMP-2 nur das Osteopontin Gen hoch. Die zusätzliche Addition der Knochensupplemente erhöht jedoch alle knochenspezifischen Gene im Vergleich zur alleinigen BMP-2 Gabe deutlich.

	+BMP/Kontrolle	+BMP/+VD <sub>3</sub>	+BMP+VD <sub>3</sub> /+VD <sub>3</sub>	+BMP+VD <sub>3</sub> /+BMP
Bone Sialoprotein	±	-	- (+ in BMP 100 ng/ml)	±
Osteocalcin	+	-	-	-
ALP	+	-	-	+
Kollagen Typ I	±	-	-	+
Cbfa1	+	-	-	±/±/+ (2, 10 bzw. 100 ng/ml)
Osteopontin	+	+	+	+
Osteonectin	-	-	-	-
Oct4	±	±	±	±

Tab. 1.: Änderung der Expression verschiedener knochenspezifischer Gene in Abhängigkeit von BMP-2 gegeben an Tag 3-5 der Kultur im Vergleich zur Kontrolle und den mit jeweils nur einem Additiv supplementierten Kulturen. VD<sub>3</sub> steht für die Supplementation der Kulturen mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und VD<sub>3</sub>.

#### 4.4.2 Chondrogenese

Bei der Ausarbeitung eines Protokolls zur Differenzierung von Chondrozyten aus embryonalen Stammzellen wurde methodisch ähnlich verfahren, wie bei der Entwicklung des Protokolls zur Osteoblasteninduktion. Die Medienadditive Insulin und Ascorbinsäure, sowie die bekannten chondrogenen Induktoren BMP-2 und TGF $\beta$ <sub>1</sub> wurden in Anlehnung an die verschiedenen Kulturphasen der EB Differenzierung auf die Zellen appliziert.

##### 4.4.2.1 Charakterisierung von Chondrozyten in Embryoid Bodies

Embryonale Stammzellkulturen supplementiert mit BMP-2, TGF $\beta$ <sub>1</sub>, Insulin und Ascorbinsäure zeigten typische morphologische Änderungen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. Ab der vierten Kulturwoche formierten sich in den supplementierten EBs Aggregate, bestehend aus kleinen rundlichen Zellen, die positiv mit Alcian Blau färbbar waren (3.5.2.). Dieser Farbstoff zeigt die Anwesenheit von Proteoglycanen wie sie in knorpeligem Gewebe vorkommen.

Im Unterschied zur Bildung der schwärzlichen mineralisierten Zellen unter Einfluss von  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und VD<sub>3</sub> wurde die dunkle Färbung der Aggregate hier hervorgerufen von Alcian Blau (Abb. 28). Polygonale Zellen wie in Abb. 28C im Hintergrund zu sehen, wurden nicht von Alcian Blau gefärbt, sondern nur runde Zellen mit einer für Chondrozyten charakteristischen Morphologie und einer extrazellulären Matrix.

Signifikante Immunfärbung für das Kollagen Typ II Protein wurde an Tag 30 in supplementierten Kulturen beobachtet, übereinstimmend mit der aktiven Sekretion und Formation einer extrazellulären Matrix ähnlich der von Chondrozyten. Der Kollagen Typ II Antikörper identifizierte in supplementierten Kulturen die fibrilläre Organisation der Kollagenmoleküle in der extrazellulären Matrix (Abb. 29A) im Gegensatz zu den Kulturen ohne Zusätze, in denen keine oder nur einige

wenige Chondrozyten differenzierten. Die chondrogene Differenzierung der supplementierten EBs wurde mittels Immunfärbung gegen adulte Knorpelproteoglycane bestätigt (Abb. 29C). Das Signalmuster zeigte eine ähnliche mit der extrazellulären Matrix assoziierte Verteilung wie das Kollagen Typ II. Die Färbung scheint hier sehr diffus, denn das von den Zellen in die extrazellulären Matrix abgeschiedene Proteoglycan wird angefärbt, nicht die einzelnen Zellen. Die Zellzusammenschlüsse erscheinen im Phasenkontrast dunkel umrandet, die einzelne Zelle jedoch ist nicht mineralisiert.

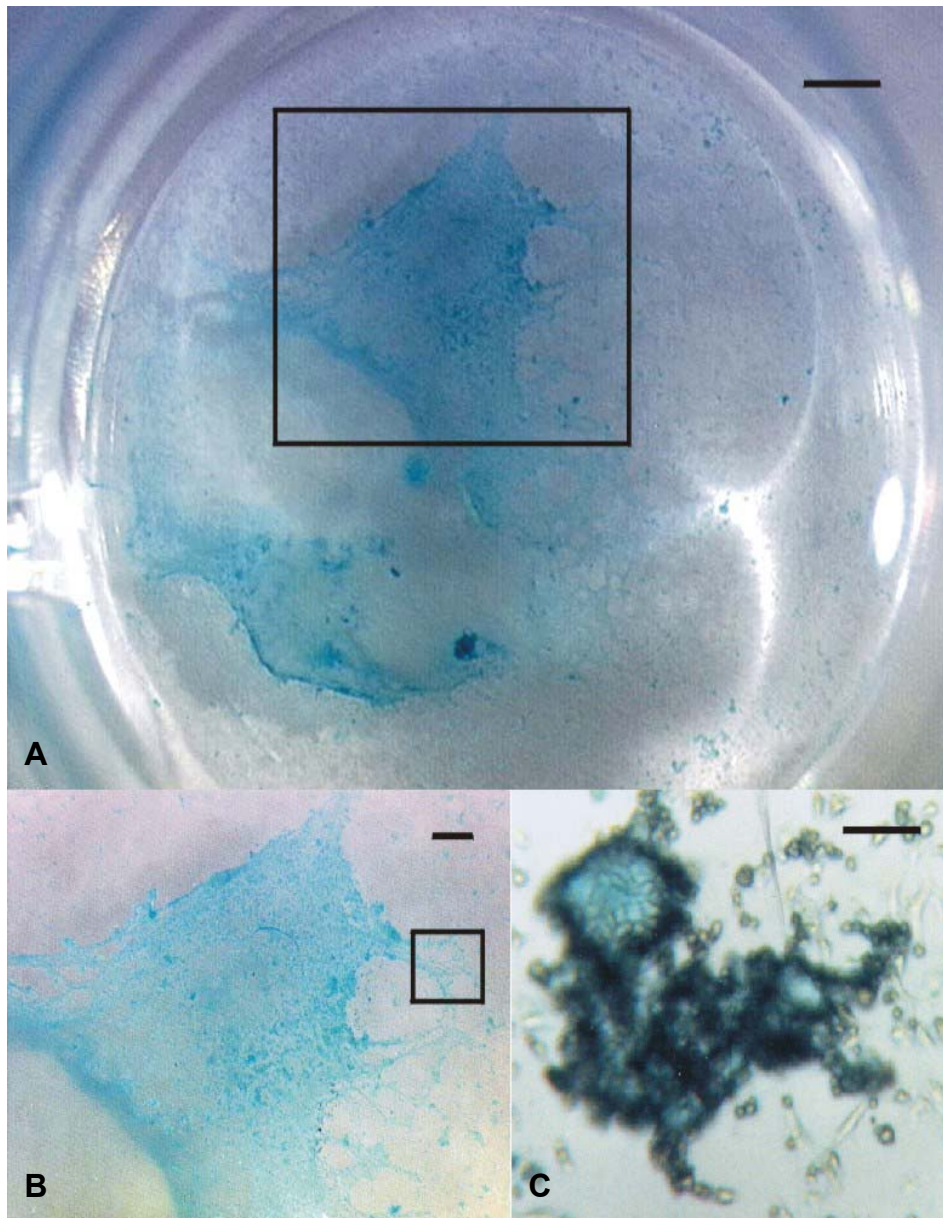


Abb. 28: Nachweis von Proteoglycanen in 30 Tage alten embryoid Bodies mit Alcian Blau. (B) und (C) zeigen die in (A) bzw. (B) markierten Flächen im Ausschnitt. Balken = 423  $\mu\text{m}$  (A), 167  $\mu\text{m}$  (B) und 8,3  $\mu\text{m}$  (C).



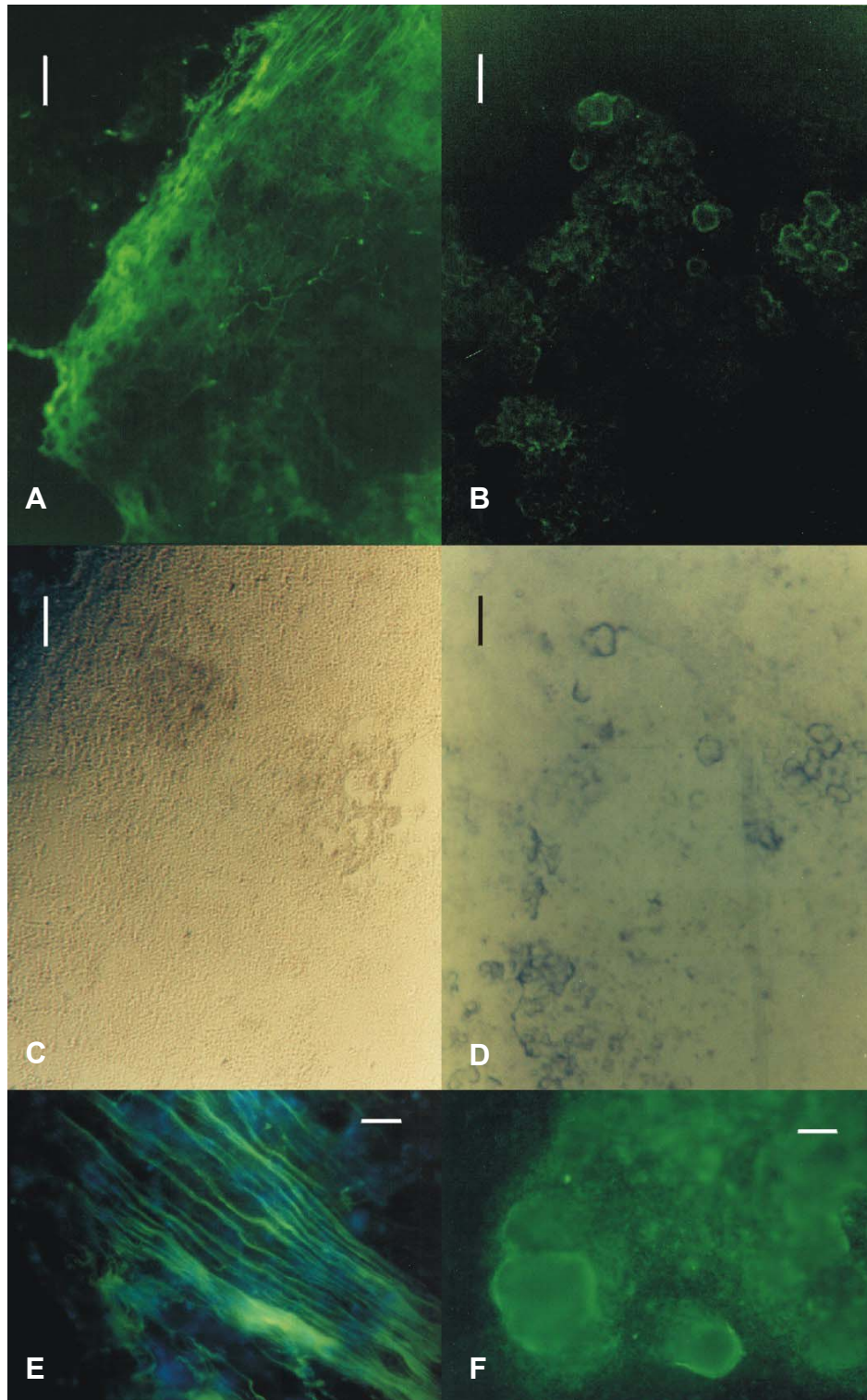


Abb. 29: Nachweis von knorpelspezifischen Matrixproteinen in 30 Tage alten EBs mit Antikörpern. (A) Färbung mit anti-Kollagen Typ II, sichtbar gemacht über den sekundären Alexa Fluor 488 Antikörper. (B) anti-Proteoglycan. Der sekundäre Antikörper ist hier ebenfalls mit Alexa Fluor 488 konjugiert. (C) und (D) zeigen die entsprechenden Bildausschnitte im Phasenkontrast. Balken = 106  $\mu\text{m}$ . (E) Vergrößerung der fibrillären Organisation des Kollagen Typ II, sichtbar über den Kollagen Typ II Antikörper. Gegenfärbung der Kerne mit *bis*-Benzimid. Balken = 8,3  $\mu\text{m}$ . (F) Vergrößerte Darstellung der anti-Proteoglycanfärbung. Balken = 26,7  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.2.2 Identifizierung von Markergenen für Knorpelgewebe

Die Expression einiger für Knorpelgewebe beschriebener Gene wurde untersucht, um auch für Knorpelgewebe ein oder mehrere Markergene identifizieren zu können. Wiederum wurden cDNA von Organen erwachsener Mäuse, cDNA muriner Embryonen (Tag 12,5 p.c.) und genomische DNA einer RT-PCR mit den verschiedenen Primerpaaren, die für die knorpelspezifischen Gene generiert wurden, unterzogen (3.4.5., 3.4.6.). Die RNA der entsprechenden Gewebe wurde zuvor isoliert (3.4.1.), quantifiziert (3.4.3) und revers transkribiert (3.4.5.). Die Längen der zu erwartenden Transkripte lag bei allen Genen um die 80 bp (2.8.).

Das einzige Aggrecantranskript konnte im hyalinen Knorpel detektiert werden, der aus den epiphysären Köpfen des Oberschenkelknochens und dem Sternum gewonnen wurde (Abb. 30). Kein Signal erscheint mit Knochengewebe. Auch an Tag 12,5 der Embryonalentwicklung war ein Aggrecantranskript nachweisbar. Undifferenzierte ES Zellen exprimierten ebenfalls Aggrecan, wenn auch in etwas niedrigeren Spiegeln. Die Expression in genomischer DNA deckte sich mit der Expression im Knorpel. Es entstand ein Amplicon gleicher Länge, da die Primer kein Intron überspannen.

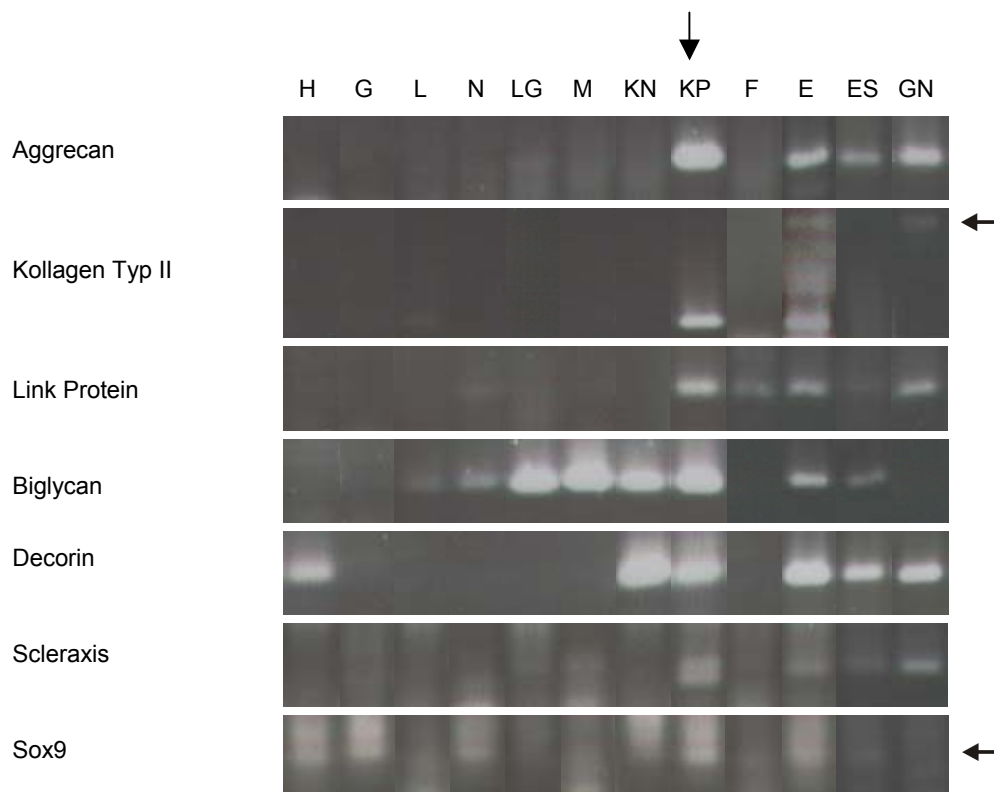


Abb. 30: Nachweis der verschiedenen in der Literatur beschriebenen knorpelspezifischen Gene mittels RT-PCR in verschiedenen Geweben. Die verschiedenen Bahnen zeigen die entsprechenden Gewebe wie angegeben. H = Herz, G = Gehirn, L = Leber, N = Niere, LG = Lunge, M = Muskel, KN = Knochen, KP = Knorpel (Pfeil oben), F = Fettgewebe, E = Embryo 12,5 p.c., ES = undifferenzierte ES Zellen + LIF, GN = genomische DNA. Der Pfeil oben rechts zeigt die Spleißvariante A des Kollagen Typ II, der Pfeil unten rechts die Größe des zu erwartenden Sox9 Transkripts.

Die unterschiedliche Expression der zwei Kollagen Typ II Spleißvarianten wurde hier deutlich. Das Kollagen Typ IIB (87 bp) wurde nur im adulten Knorpel exprimiert. Der Typ IIA (215 bp) dagegen wurde während der Embryonalentwicklung in verschiedenen Geweben exprimiert, war deshalb auch im 12,5 Tage alten Embryo detektierbar. Das dort detektierte Transkript entsprach der Größe des Transkripts, das auch mit genomischer DNA entstand (Abb. 30, Pfeil rechts oben), da die Spleißvariante Typ IIA Exon 1, 2 und 3 umfasst, der Typ IIB hingegen von Exon 1 nach 3 gespleißt wird. Undifferenzierte ES Zellen exprimierten kein Kollagen Typ II.

Link Protein war am stärksten in Knorpelgewebe exprimiert. Decorin und Biglycan kamen als Markergene nicht in die engere Auswahl, da sie außer im Knorpel zusätzlich im Knochen und anderen Geweben exprimiert wurden. Die Transkriptionsfaktoren Sox9 und Scleraxis wurden im Knorpel exprimiert, nicht aber im Knochen. Sox9 wurde außerdem im Herzen, der Niere und im Nervensystem exprimiert allerdings nur in sehr niedrigen Spiegeln. Das entsprechende Transkript der zu erwartenden Länge ist in Abbildung 30 auf der rechten Seite unten mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die Chondrogenese war an Tag 12,5 *in vivo* schon soweit fortgeschritten, dass alle hier untersuchten Gene von den Embryonen exprimiert wurden.

#### **4.4.2.3 Einfluss der Medienadditive BMP-2, TGF $\beta$ 1, Insulin und Ascorbinsäure auf die Expression chondrozyten- und entwicklungsspezifischer Gene**

##### **4.4.2.3.1 Abhängigkeit der Genexpression von BMP-2**

Die quantitative TaqMan PCR Analyse wurde herangezogen, um die Varianz der RNA Expression der verschiedenen ausgewählten knorpelspezifischen Gene in Antwort auf BMP-2 zu untersuchen. Die EBs wurden an den Tagen 3-5 (während der Suspensionskultur) mit 2 ng/ml oder 10 ng/ml BMP-2 supplementiert. Totale RNA wurde an Tag 32 extrahiert (3.4.1.) und die Expression verschiedener Gene normiert auf die GAPDH Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im TaqMan (3.4.7.) quantifiziert.

Die Expression der Gene Aggrecan und Link Protein waren bei der Gabe von 2 ng/ml BMP-2 im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant erhöht (Abb. 31). Die Erhöhung der BMP-2 Konzentration auf 10 ng/ml induzierte die Aggrecanexpression auf das 2,5-fache Niveau der Kontrolle ( $P < 0,1$ ), die Link Protein Expression war nicht deutlich erhöht (1,45;  $P < 0,1$ ).

Eine signifikante Erhöhung der Expression beider Spleißvarianten des Kollagens und Scleraxis um den Faktor 2 fand sich bei Supplementation der Zellen mit BMP-2 in einer Konzentration von 2 ng/ml ( $P < 0,1$ ). Die Steigerung der BMP-2 Konzentration führte zu einer weiteren Induktion der entsprechenden Gene.

Bei Gabe von 2 ng/ml BMP-2 war die Expression der beiden leucinreichen kleinen Proteoglycane Decorin und Biglycan dagegen signifikant gegenüber der Kontrolle vermindert. Erst eine Konzentration von 10 ng/ml hob den Wert beider Expressionen auf den der Kontrolle an. Die Expression des Sox9 Gens, das für den knorpelspezifischen HMG- Transkriptionsfaktor kodiert, lag in den mit beiden Konzentrationen an BMP-2 supplementierten EBs bei den Basiswerten der Kontrolle. Die Expression des zweiten HMG- Transkriptionsfaktors Sox2 war bei Gabe von 2 ng/ml etwas erhöht, 10 ng/ml änderte die Sox2 Expression nicht signifikant.

10 ng/ml BMP-2 senkten die Expression des Markergens für undifferenzierte Zellen Oct4 signifikant auf 50% der Kontrolle. Die mit 10 ng/ml BMP-2 supplementierten Kontrollen enthielten demnach eine geringere Anzahl undifferenzierte Zellen. BMP-2 kann also in der höheren Konzentration eine terminale Differenzierung der Zellen induzieren.

Induktionsfaktor

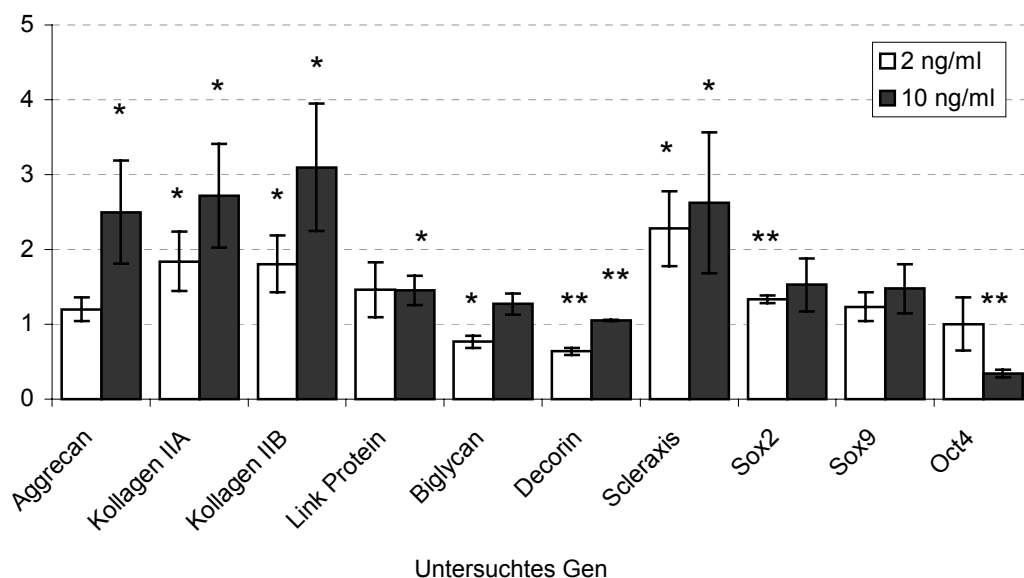


Abb. 31: Vergleich der Expression der knorpelspezifischen Gene in 32 Tage alten Embryoid Bodies in Abhängigkeit von 2 ng/ml oder 10 ng/ml BMP-2. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente, bestimmt über quantitative PCR Analyse im TaqMan. Kontrollwerte wurden als 1 gesetzt. \* $P < 0,1$ ; \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.4.2.3.2 Synergistische Wirkung von BMP-2, TGF $\beta$ 1, Insulin und Ascorbinsäure

Neben BMP-2 wurden andere Medienadditive wie TGF $\beta$ 1, Insulin und Ascorbinsäure auf ihre Fähigkeit hin getestet, ähnliche Antworten auf Expressionsebene in den embryonalen Zellkörperchen auszulösen. Der in der Literatur beschriebene anabole Effekt des Insulin und der Ascorbinsäure und der Einfluss des Wachstumsfaktors TGF $\beta$ 1 auf die BMP-2 induzierte

Differenzierung der embryonalen Stammzellen sollte quantitativ über TaqMan PCR Analyse bestimmt werden.

Tabelle 2 zeigt die unterschiedlichen Kombinationen der Medienzusätze zu den verschiedenen Kulturphasen. Die verwendeten Konzentrationen entsprachen 10 ng/ml BMP-2, 2 ng/ml TGF $\beta_1$ , 1  $\mu$ g/ml Insulin und 50  $\mu$ g/ml Ascorbinsäure.

Abbildung 32 zeigt die Änderung der verschiedenen im Knorpel exprimierten Gene in den mit den entsprechenden Supplementkombinationen behandelten Stammzellkulturen als Indikationsfaktoren gegenüber der Kontrolle gemessen an Tag 32 der Kultur. Der Einfluss von BMP-2 alleine wurde in 4.4.2.3.1. gezeigt. TGF $\beta_1$  (B) rief eine etwa 2-fache Steigerung der beiden Kollagen Typ II Spleißvarianten im Vergleich zur Kontrolle hervor. Der synergistische Effekt der beiden Wachstumsfaktoren TGF $\beta_1$  und BMP-2 (C) wurde in der gesteigerten Expression von Aggrecan, Link Protein und Kollagen Typ IIA im Gegensatz zu den Kulturen, die mit nur jeweils einem der beiden supplementiert worden sind, deutlich.

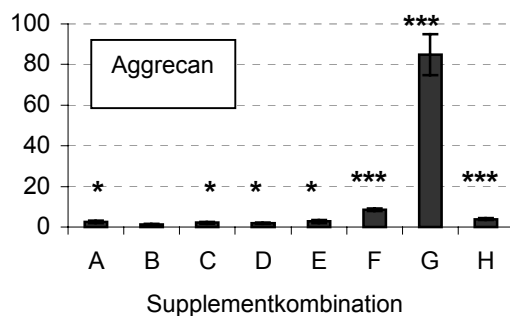
Supplementkombination		Tag 1-3 (hängende Tropfen)	Tag 3-5 (Suspensionskultur)	Ab Tag 5 (24-Loch Zellkulturplatten)
<b>A</b>	BMP		BMP-2	
<b>B</b>	TGF		TGF $\beta_1$	
<b>C</b>	BMP+TGF		BMP-2 TGF $\beta_1$	
<b>D</b>	BMP+TGF+IA		BMP-2 TGF $\beta_1$ Insulin Ascorbinsäure	
<b>E</b>	BMP+IA 5-~		BMP-2	Insulin Ascorbinsäure
<b>F</b>	BMP+TGF+IA 5-~		BMP-2 TGF $\beta_1$	Insulin Ascorbinsäure
<b>G</b>	BMP+TGF+IA 3-~		BMP-2 TGF $\beta_1$	Insulin Ascorbinsäure BMP-2
<b>H</b>	TGF+IA 5-~		TGF $\beta_1$	Insulin Ascorbinsäure

Tab. 2: Unterschiedliche Kombinationen der Medienzusätze zu den verschiedenen Kulturphasen. Die verwendeten Konzentrationen entsprachen 10 ng/ml BMP-2, 2 ng/ml TGF $\beta_1$ , 1  $\mu$ g/ml Insulin und 50  $\mu$ g/ml Ascorbinsäure. ~ gibt das Ende der Kulturdauer an.

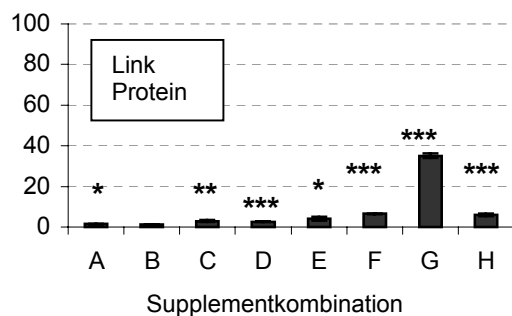
Die zusätzliche Gabe von Insulin und Ascorbinsäure zwischen Tag 3 und 5 (D) steigerte den Synergismus gemessen an der Expression des Aggrecans, des Link Proteins und des Kollagens Typ II kaum. Insulin und Ascorbinsäure gegeben ab Tag 5 über die gesamte Kulturdauer jedoch steigerten sowohl den alleinigen Effekt von BMP-2 wie auch den von TGF $\beta_1$  (Supplementkombinationen E und H). Bei Addition von Insulin und Ascorbinsäure zu BMP-2 induzierten Kulturen war die Expressionen der Gene Kollagen Typ IIA und Aggrecan schwach um den Faktor 1,2 gesteigert. Link Protein und Kollagen Typ IIB waren 2,7-2,8-fach gegenüber BMP-2

alleine induziert. Insulin und Ascorbinsäure erhöhten die TGF Antwort etwa um das 3 bis 4-fache. Die Supplemente riefen für sich genommen eine erhöhte Expression der knorpelspezifischen Gene hervor, besonders der zwei als Markergene identifizierten Gene Aggrecan und Kollagen Typ II (4.4.2.2.). Auf Grund dessen wurden alle vier Additive zusammen gegeben, aber zu verschiedenen Zeiten der Kultur (F und G). Die Expression des Scleraxis Gens verhält sich umgekehrt zur Expression der Aggrecan, Link Protein und Kollagen Typ II Gene. Die Kombinationen, in denen die Additive für eine Steigerung der Expression sorgten, führten hier zu einer immer weiteren Abnahme der Scleraxis Expression. Supplementkombination G senkte die Scleraxis Expression bis auf die Hälfte der Kontrolle (P= 0,001). Auch die Expression des Sox2 folgt diesem Muster. Um den Faktor 1,5 induziert ist die Sox9 Expression unter Einfluss der meisten Supplemente. Supplementkombination G zeigt jedoch auch hier eine signifikante Verminderung der Sox9 Antwort (P= 0,001).

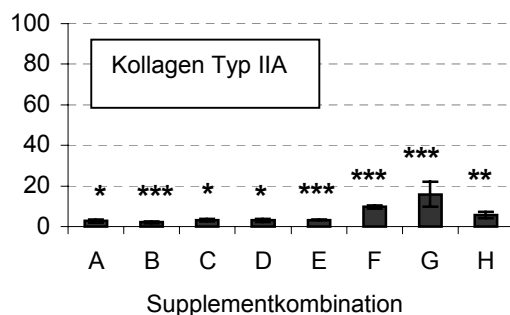
Induktionsfaktor



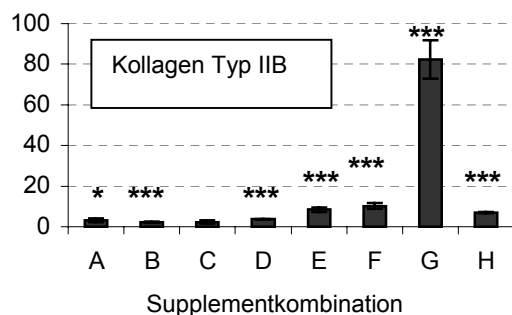
Induktionsfaktor



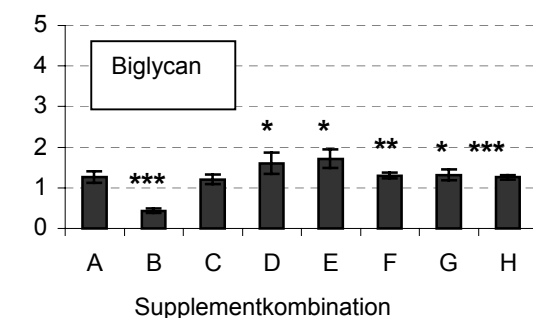
Induktionsfaktor



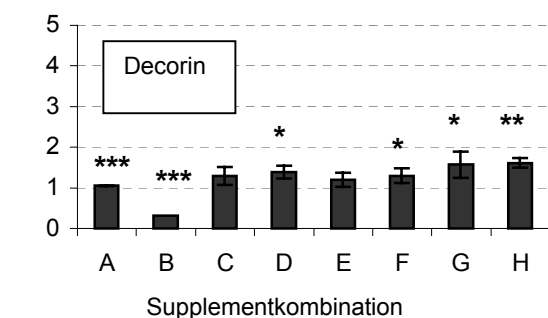
Induktionsfaktor



Induktionsfaktor



Induktionsfaktor



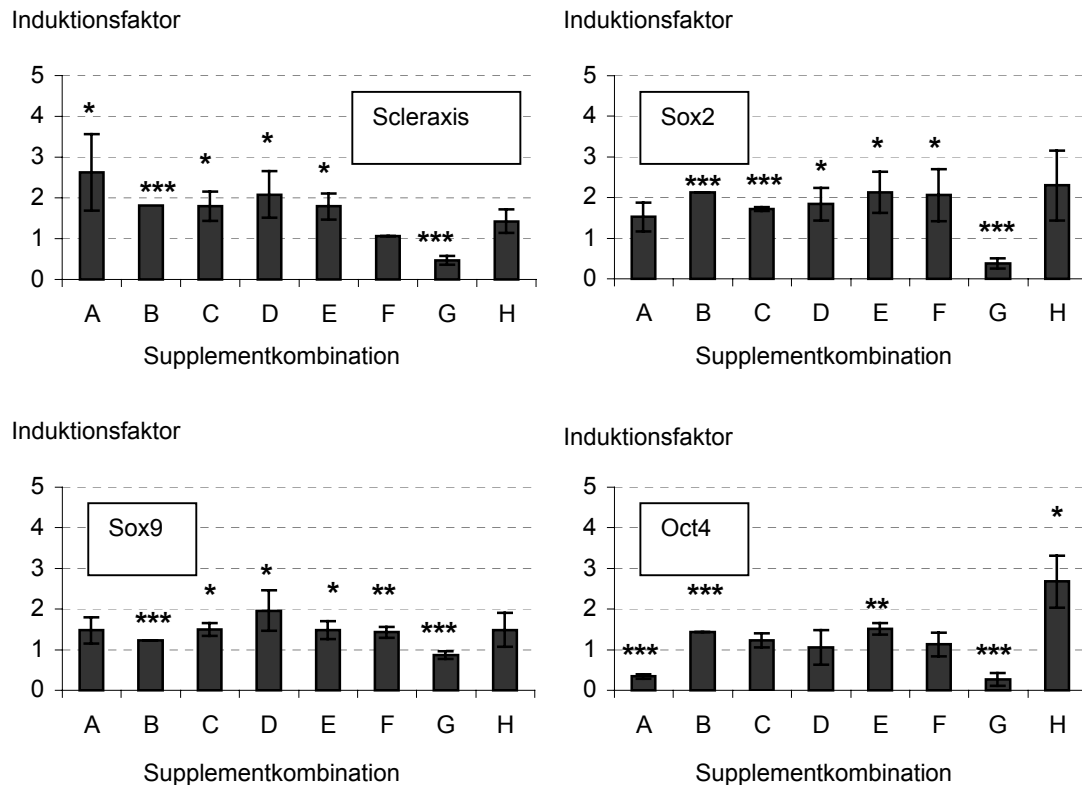


Abb. 32: Darstellung der über TaqMan PCR Analyse ermittelten Expressionsniveaus knorpelspezifischer Gene in 32 Tage alten Embryoid Bodies, supplementiert mit verschiedenen Kombinationen aus BMP-2, TGF $\beta$ 1, Insulin und Ascorbinsäure (siehe Tabelle 2). Kontrollwerte liegen bei 1. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, n = 3. \*P < 0,1; \*\*P < 0,01; \*\*\*P = 0,001.

Die Verschiebung der Expressionsmuster in Richtung der chondrogenen Genexpression charakterisiert ergo die durch BMP-2 induzierten Differenzierungsprozesse. Noch weiter gesteigert sind die chondrogenen Prozesse durch TGF $\beta$ 1, Insulin und Ascorbinsäure.

#### 4.4.2.3.3 Kinetische Analyse der knorpelspezifischen Genexpression während der EB Differenzierung

Das Ausmaß der chondrogenen Differenzierung in BMP-2, TGF $\beta$ 1, Insulin und Ascorbinsäure supplementierten Kulturen (Supplementkombination G, Tabelle 2) wurde über die zeitliche Abfolge von 35 Kulturtagen auf der Basis der Expression verschiedener Knorpelmatrixkomponenten untersucht (Abb. 33). Da das Ausmaß der Expressionsänderung der knorpelspezifischen Gene von der punktuellen (Tag 3-5, F) oder kontinuierlichen, chronischen Gabe von BMP-2 (Tag 3-~, G) abhängig zu sein schien, wurde die stärkere Induktion durch die chronische Verabreichung des BMP-2 über den zeitlichen Verlauf der EB Kultur verfolgt.

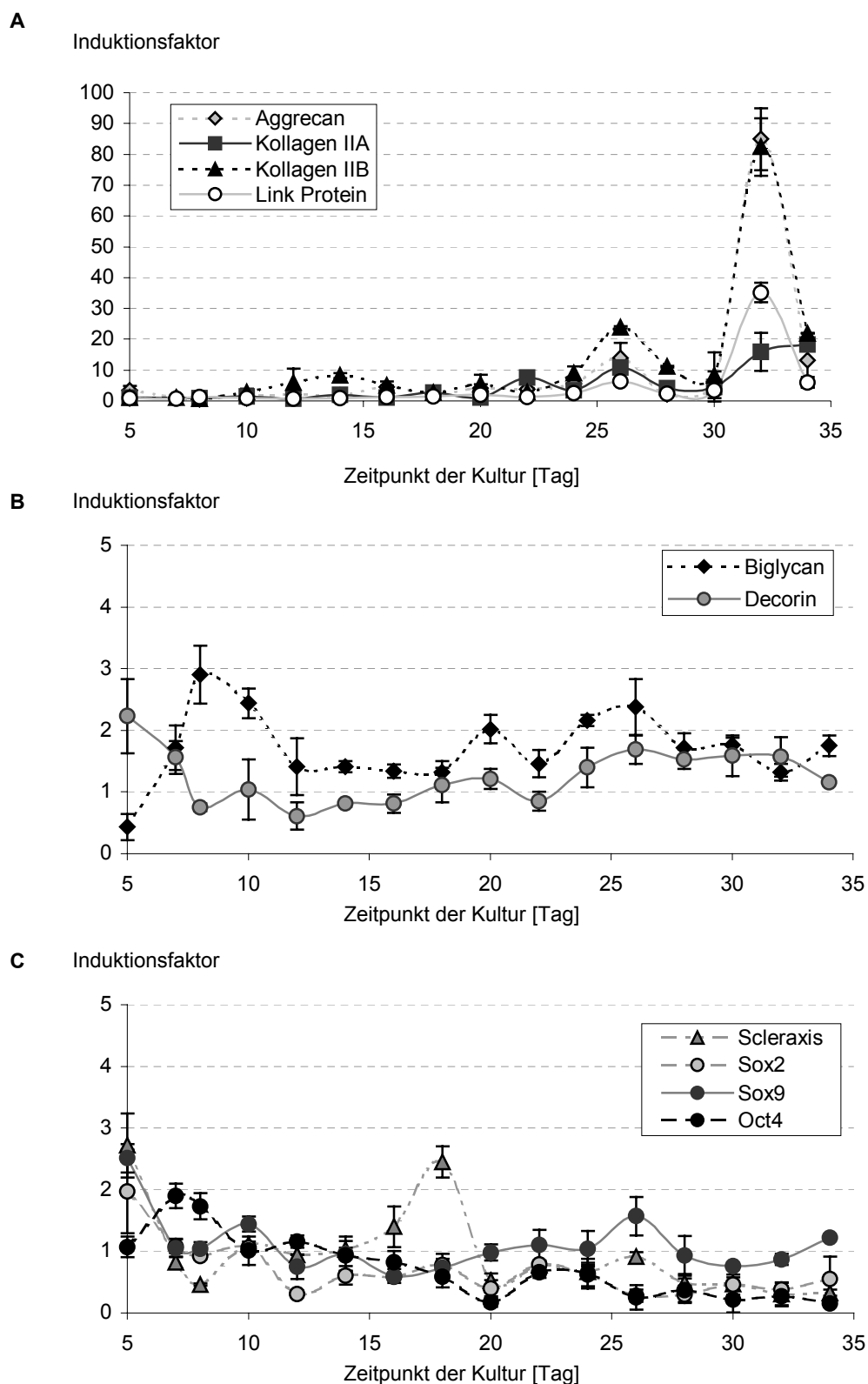


Abb. 33: Expression der chondrozytenspezifischen Gene im Verlauf der EB Differenzierung induziert durch Supplementkombination G. (A) Aggrecan, Kollagen Typ II A und B und Link Protein, (B) Biglycan und Decorin, (C) Scleraxis, Sox2 bzw. Sox9 und Oct4. Die Ergebnisse zeigen den Induktionsfaktor der Expression, der über TaqMan PCR Analyse ermittelt wurde, normiert auf die GAPDH Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$  unabhängige Experimente, jeweils 20 EBs).



Während der ersten drei Kulturwochen des BMP-2 induzierten Differenzierungsprogrammes konnte nur eine geringe Aggrecan, Link Protein und Kollagen Typ II Expression detektiert werden. Erst ab der dritten Kulturwoche an Tag 26 stieg z.B. die Aggrecanexpression signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle um den Faktor 14 ( $P < 0,1$ ).

An Tag 32 wurden für Aggrecan sowie für alle anderen bestimmten Gene die schon unter 4.4.2.3.2. beschriebenen Werte erreicht. Die markanteste Steigerung der Expression von Aggrecan, Link Protein und Kollagen Typ II erfolgte an Tag 32.

Konsistent mit dem Profil der Aggrecanexpression lag die Link Protein Expression an den Tagen 24-27 ebenfalls signifikant über dem Kontrollspiegel (Faktor 6,3;  $P = 0,001$ ), minimal erhöhte Werte ließen sich jedoch schon ab Tag 16 feststellen.

An Tag 26 zeigte die Quantifizierung des Kollagen Typ II Transkripts in seiner Spleißvariante A eine Erhöhung um den Faktor 11, die der Spleißvariante B um den Faktor 24. Die Transkription der Spleißvariante B erreichte schon an Tag 14 das 8-fache des Kontrollniveaus, das Spleißen des Kollagen Typ II Primärtranskriptes zum Typ IIA war erstmalig an Tag 22 auf das 8-fache der Kontrolle gesteigert. In der frühen Phase der Differenzierung zwischen Tag 5 und Tag 20 war die Expression des Kollagen Typ II A stetig um den Faktor 2 angestiegen.

Transkripte für das Biglycan und Decorin Gen konnten über alle Stadien der chondrogenen Differenzierung hindurch detektiert werden. Zur Reifungsphase am Ende der Kultur jedoch wurden beide Gene etwa auf das 1,5 bis 2-fache der Kontrolle hochreguliert. Diese Phase begann offenbar in der vierten Kulturwoche (Tag 21-28).

Die Transkriptionsfaktoren zeigten konstant über die gesamte Kulturperiode ein ähnliches Expressionsmuster. Das Niveau dieser Transkripte erhöhte sich im Mittel nicht signifikant während der chondrogenen Differenzierung der ES Zellen, es sank sogar im Vergleich zur Kontrolle. Scleraxis und Sox9 sind schon an Tag 5 in den EBs exprimiert; ein Zeichen für ihre Beteiligung an der frühen Differenzierung der Zellen in der die Differenzierungsrichtung der Zellen determiniert wird.

Die Scleraxistranskripte griffen später an den Tagen 16-19 nochmals in die Differenzierungsprozesse ein. Die Sox9 Expression war gegenüber der Kontrolle ein zweites Mal an den Tagen 9-11 und ein drittes Mal an den Tagen 25-27 gesteigert. Zusätzlich zu den allgemeinen Aufgaben während der frühen Entwicklung scheinen beide Transkriptionfaktoren eine spezielle Rolle bei der Differenzierung zu Knorpelgewebe zu übernehmen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kulturen, die mit BMP-2,  $TGF\beta_1$ , Insulin und Ascorbinsäure supplementiert wurden, mRNAs eines chondrogenen Phänotyps exprimierten, deren Expression zeitabhängig war.

#### 4.4.2.4 Bestimmung des Proteoglycangehalts in Embryoid Bodies

Das Ausmaß der chondrogenen Differenzierung unter Einfluss verschiedener Supplemente wurde im Hinblick auf die Proteoglycansynthese mittels des metachromatischen Tests (3.6.) untersucht. Die von den Zellen in die extrazelluläre Matrix sezernierten Proteoglycane wurden an Tag 32 mit Guanidin/HCl extrahiert und zwei Tage später das Zelllysats mit dem DMMB Farbstoff versetzt. Die Änderung der Absorption des Farbstoffs, die wegen der Anwesenheit von Proteoglycanen entsteht, wurde spektrophotometrisch quantifiziert und an Hand einer Eichgeraden die Menge der von den Zellen abgesonderten Proteoglycane festgelegt.

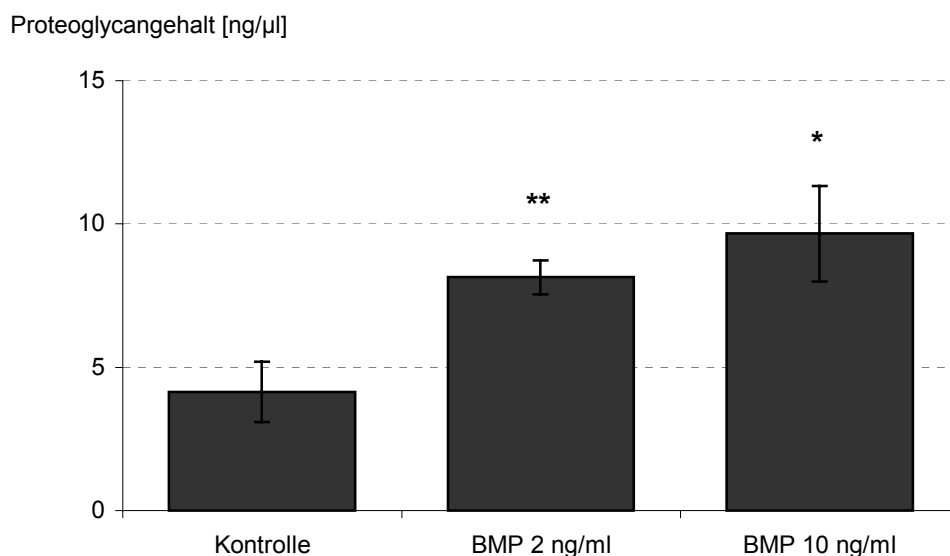


Abb. 34: Proteoglycangehalt der EB-Extrakte an Tag 32. BMP-2 führt zu einer gesteigerten Proteoglycansynthese sowohl in einer Konzentration von 2 ng/ml wie auch bei 10 ng/ml. \* $P < 0,1$ ; \*\* $P < 0,01$ . Mittelwerte dreier Experimente  $\pm$  Standardabweichungen.

In Anlehnung an die Expression des Aggrecangens, welches für die häufigste Proteoglycanart im Knorpel kodiert, verändert sich die Synthese der Proteoglycane unter Einfluss von BMP-2,  $TGF\beta_1$ , Insulin oder Ascorbinsäure.

BMP-2 in einer Konzentration von 2 ng/ml löste eine zweifache Induktion der Proteoglycansynthese aus (Abb. 34,  $P < 0,01$ ), 10 ng/ml BMP-2 erhöhte den Proteoglycangehalt der EBs um das 2,3-fache ( $P < 0,1$ ).

Diese Daten zeigen, dass die Applikation von BMP-2 eine Erhöhung der negativ geladenen extrazellulären Matrix, die durch Proteoglycane charakterisiert wird, verursachte. Dieser Effekt wurde durch  $TGF\beta_1$  erniedrigt (Abb. 35, C),  $TGF\beta_1$  alleine (B) veränderte den Proteoglycanspiegel gegenüber dem Kontrollwert nicht.

Insulin und Ascorbin erhöhten zwar den von  $TGF\beta_1$  nicht veränderten Proteoglycangehalt auf das 1,3-fache des Kontrollwerts (H), was aber nicht signifikant ist. Die von BMP-2 induzierte Proteoglycansynthese wurde von Insulin und Ascorbin um den Faktor 4,2 erhöht ( $P < 0,01$ , E). Die

Kombination aller vier Supplemente (F) erzeugte in Anlehnung an die Aggrecanexpression eine massive Induktion des Proteoglycangehalts in den EBs. Die Induktionsrate lag hier bei 6,9 (P= 0,001).

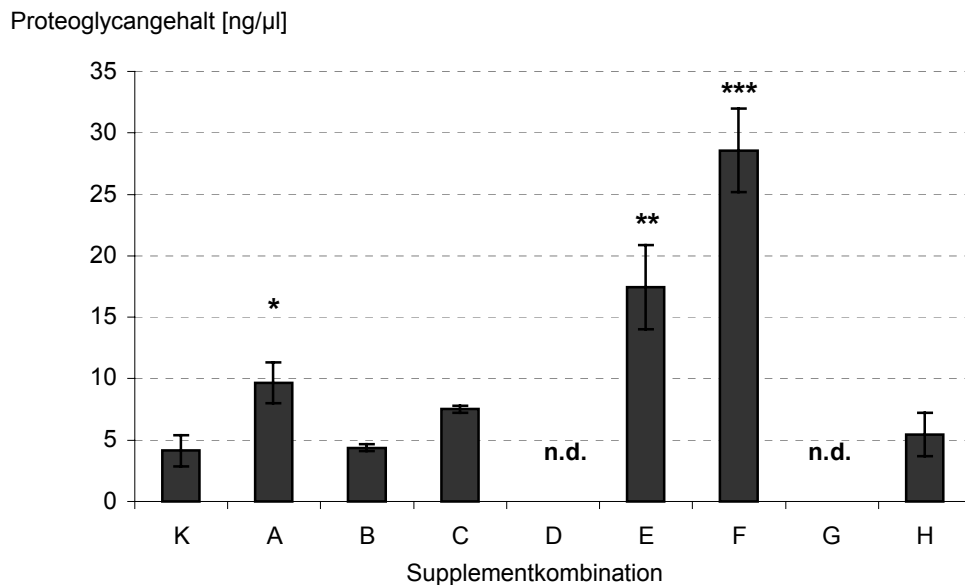


Abb. 35: Proteoglycangehalt der Extrakte 32 Tage alter EBs, supplementiert mit verschiedenen Kombinationen aus BMP-2, TGFβ<sub>1</sub>, Insulin und Ascorbinsäure (siehe Tabelle 2, Seite 79). K = Kontrolle. Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3. \*P < 0,1; \*\*P < 0,01; \*\*\*P = 0,001. n.d. = Nicht determiniert.

#### 4.4.3 Simultane Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten

Zur Vereinfachung des Testsystems sollte ermittelt werden, ob eine gemeinsame Induktion der Osteoblasten und Chondrozyten durch additive Applikation der für die einzelnen Differenzierungswege notwendigen Supplemente möglich wäre.

Die ES Zellen wurden zu diesem Zweck in der Suspensionskultur mit BMP-2 [10 ng/ml] und TGFβ<sub>1</sub> [2 ng/ml] supplementiert. Ab Tag 5 enthielt das Kulturmedium BMP-2 [10 ng/ml], 1,25-OH Vitamin D<sub>3</sub> [5x10<sup>-8</sup> M], Insulin [1 μg/ml], Ascorbinsäure [50 μg/ml] und β-Glycerophosphat [10 mM]. Die Zellen wurden an Tag 32 der Kultur lysiert. Die Expression der knorpel- und knochenspezifischen Gene wurde mittels real-time PCR analytisch quantifiziert (3.4.7.).

Tabelle 3 und Abbildung 36 zeigen die veränderte Expression der untersuchten Gene im Bezug zum Niveau der durch die einzelnen Supplemente erzielten Induktionen. Wurden die Zellen mit der Kombination der Supplemente der Knorpel- und Knochenzellinduktion supplementiert, war die Expression der osteoblastenverwandten Marker merklich gegenüber der alleinigen Behandlung mit β-Glycerophosphat, Ascorbinsäure und VD<sub>3</sub> reduziert, die der knorpelspezifischen Gene lag deutlich unter den Expressionsspiegeln, die mit BMP-2, TGFβ<sub>1</sub>, Insulin und Ascorbinsäure alleine erzielt wurden.

	Bone Sialoprotein	Osteocalcin	ALP	Cbfa1	Kollagen Typ I	Osteopontin	Osteonectin	Aggrecan
A	26,45	12,89	4,38	9,17	1,73	1,89	1,52	84,91
B	1,73	1,64	0,95	0,88	2,2	2,25	0,97	2,27

Link Protein	Kollagen Typ IIA	Kollagen Typ IIB	Biglycan	Decorin	Scleraxis	Sox9	Oct4
35,1	15,91	82,39	1,32	1,57	0,47	0,87	0,81
1,3	4,2	30,81	0,65	1,47	0,81	0,74	0,31

Tab. 3: Induktionsfaktoren der knochen- und knorpelspezifischen Gene im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle normiert auf die GAPDH Expression. A = Behandlung mit jeweils nur einer Supplementkombination zur Osteoblasten- oder Chondrozyteninduktion. Die Expression der knochenspezifischen Gene wurde nach Kultivierung der Zellen mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$  ermittelt, die der knorpelspezifischen Gene in EBs, die mit BMP-2, TGF $\beta_1$ , Insulin und Ascorbinsäure supplementiert wurden (Supplementkombination G, siehe Tabelle 2). B = Simultane Differenzierung mit allen Additiven.

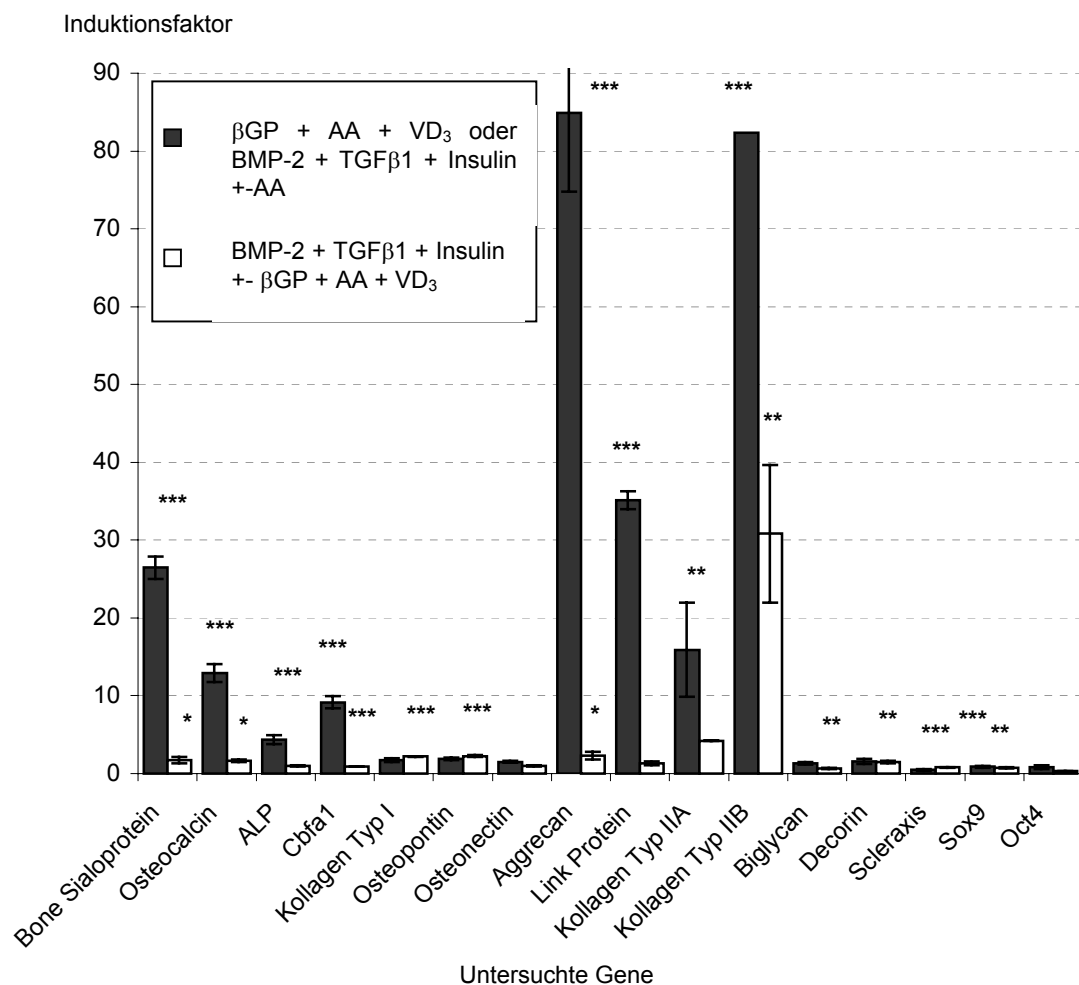


Abb. 36: Graphische Darstellung der in Tabelle 3 gezeigten Induktionsfaktoren, die mit quantitativer TaqMan PCR Analyse bestimmt wurden. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, n = 3. \*P < 0,1; \*\*P < 0,01; \*\*\*P = 0,001, normiert auf die GAPDH Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die gleich 1 gesetzt wurde.

Die Gene Bone Sialoprotein, Osteocalcin, ALP, Cbfa1, Osteonectin, Aggrecan, Link Protein, Kollagen Typ II, und Biglycan wiesen eine deutlich niedrigere Expression unter Einfluss des Supplementcocktails auf. Dagegen waren Kollagen Typ I, Osteopontin, Scleraxis wie auch Oct4 leicht induziert. Die Decorin und die Sox9 Expression änderte sich unter beiden Bedingungen nicht merklich.

Damit wäre gezeigt, dass es auf Grund der gegenseitigen Inhibierung der Differenzierungslinien nicht möglich ist, Chondrozyten und Osteoblasten unter den beschriebenen Kulturbedingungen simultan zu differenzieren.

#### **4.5 Der EST – Vergleich zwischen klassischer Auswertung und molekularer Ebene**

Um die Eignung der leicht quantifizierbaren Expressionsanalyse als neue Endpunkte für den EST zu bestätigen, wurde das embryotoxische Potential von sechs Testchemikalien untersucht, deren teratogenes Potential *in vivo* bekannt war. Die embryonalen Stammzellen wurden über die gesamte Differenzierungsperiode den Chemikalien exponiert. Zusätzlich zum Endpunkt Herz wurden für die Untersuchung weiterer toxikologischer Endpunkte außerdem die Protokolle zur Nerven-, Chondrozyten- und Osteoblastendifferenzierung eingesetzt. Zusätzlich zu den ermittelten Additiven zur spezifischen Differenzierung wurden die EBs von Tag 0 an über die gesamte Kulturdauer mit den Testchemikalien versetzt. Für jede Konzentration wurde eine 24-Lochplatte in Dreifachbestimmung benutzt.

Für jede Testsubstanz wurden die folgenden sieben Endpunkte ermittelt:

- Zytotoxizität der Substanz auf „erwachsenen“ 3T3 Zellen ermittelt mit dem MTT-Test nach einer Kulturdauer von 10 Tagen ( $IC_{50}MTT3T3$ )
- Zytotoxizität der Substanz auf embryonalen Stammzellen ( $D_3$ ) ermittelt mit dem MTT-Test ebenfalls an Tag 10 der Kultur ( $IC_{50}MTTD_3$ )
- Inhibierung der Kardiomyozytendifferenzierung, ermittelt über mikroskopische Auswertung der schlagenden Areale an Tag 10 ( $ID_{50}K$ ). Hier galt ein Experiment als akzeptabel, wenn mindestens 21 von den 24 EBs in den Kontrollkulturen an Differenzierungstag 10 kontraktile Areale enthielten.
- Inhibierung der Kardiomyozytendifferenzierung ermittelt an Tag 8 der Kultur mit quantitativer Expressionsanalyse des herzspezifischen Markergens  $\alpha/\beta$ -MHC über TaqMan PCR ( $ID_{50}H$ )
- Inhibierung der Nervenzellendifferenzierung ermittelt an Tag 14 der Kultur mit quantitativer Expressionsanalyse des neuronalen Markergens NFM über TaqMan PCR ( $ID_{50}N$ )

- Inhibierung der Osteoblastendifferenzierung ermittelt an Tag 30 der Kultur mit quantitativer Expressionsanalyse des osteoblastenspezifischen Markergens Osteocalcin über TaqMan PCR (ID<sub>50</sub>KN)
- Inhibierung der Chondrozytendifferenzierung ermittelt an Tag 32 der Kultur mit quantitativer Expressionsanalyse des chondrozytenspezifischen Markergens Aggrecan über TaqMan PCR (ID<sub>50</sub>KP)

Die verschiedenen ermittelten Werte (Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente) wurden als Prozent der Kontrolle, die gleich 100 gesetzt wurde, gegen die entsprechenden verwendeten Konzentrationen aufgetragen. Die Konzentration des Teststoffes, bei der die Inhibierung des Wachstums (IC<sub>50</sub>) oder der Differenzierung und der Genexpression halbmaximal war (ID<sub>50</sub>), wurde aus diesen Dosis-Wirkungskurven durch lineare Interpolation ermittelt.

Die Ermittlung des IC<sub>50</sub> geschah mittels MTT-Test auf embryonalen D<sub>3</sub> Zellen wie auch auf 3T3 Zellen (3.3.2.). Auf zellulärer Ebene konnte die Entwicklung kardiärer Zellen sehr einfach auf Grund ihrer kontraktilen Aktivität im Phasenkontrastmikroskop bestimmt werden. Die kontraktile Aktivität kann unter Einfluss von Chemikalien in einer konzentrationsabhängigen Weise reduziert werden. Die Nutzung dieses Endpunktes zog jedoch nicht die Größe und Anzahl der in einem EB vorkommenden kontraktilen Areale in Betracht, er detektiert vielmehr nur die An- oder Abwesenheit kontraktiler Areale. Deshalb wurde die quantitative Analyse der herzspezifischen MHC mRNA als eine objektivere Methode zur Ermittlung der Herzdifferenzierung herangezogen. Für das Herzmodell wurde die Verwendung des Primerpaares, dass beide Isoformen,  $\alpha$  und  $\beta$ , detektieren kann (4.2.2., 4.2.3.), für am geeignetsten befunden. In einem einzelnen TaqMan Lauf können so beide Parameter abgedeckt werden.

Die Auswertung erfolgte an den Tagen, an denen die Markergene ihre Maximalexpression zeigten.

#### **4.5.1 Bestimmung der Endpunkte des EST für sechs Testsubstanzen**

##### **4.5.1.1 Penicillin G**

Dem Penicillin G wird als weit verbreitetem Antibiotikum kein teratogenes Potential *in vivo* zugeschrieben. Es zeigte auf 3T3 Zellen keine Zytotoxizität im Konzentrationsbereich bis 1000 µg/ml (Abb. 37). Die embryonalen D<sub>3</sub> Zellen waren eindeutig sensibler für Penicillin G. Die Inhibierung der Kardiomyozytendifferenzierung ist offenbar auf das zytotoxische Potential der Substanz zurückzuführen, da der Kurvenverlauf der Kontraktion dem des Verlaufs der MTT-Kurve an D<sub>3</sub> Zellen entspricht. Die sich aus dem Kurvenverlauf ergebenden IC<sub>50</sub>MTTD<sub>3</sub> bzw. ID<sub>50</sub>K Werte [800 µg/ml und 750 µg/ml] liegen daher sehr nahe beieinander. Penicillin G ist allerdings auf den D<sub>3</sub> Zellen *in vitro* in einem Konzentrationsbereich zytotoxisch, der *in vivo* therapeutisch nicht erreicht werden kann.

Bei Übertragung des Herzmodells auf die molekulare Ebene auf Basis der Untersuchung der Expression des Markergens MHC in seinen beiden Isoformen, erkennt man, dass dieser Test sensativer ist. Schon bei Konzentrationen um 300  $\mu\text{g/ml}$  ist die MHC Expression auf etwa 92% der unbehandelten Kontrolle abgesunken, was mit dem Auszählen der schlagenden EBs nicht nachweisbar ist. Unter Umständen war hier die Anzahl der schlagenden Areale im EB oder deren Größe schon leicht dezimiert, aber trotzdem kann noch jeder EB ein schlagendes Areal enthalten. Der  $\text{ID}_{50}\text{H}$  lag in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie der bei der Auszählung der schlagenden Areale gefundene, sogar noch etwas höher [890  $\mu\text{g/ml}$ ].

Die Differenzierung zu Nervenzellen war ebenfalls sensativer als die semiquantitative Auszählung der Kontraktionen. Auch hier wurden schon bei 300  $\mu\text{g/ml}$  leicht reduzierte Expressionsspiegel des NFM Gens verzeichnet. Der ermittelte  $\text{ID}_{50}\text{N}$  lag mit 910  $\mu\text{g/ml}$  nicht viel höher als der  $\text{ID}_{50}\text{H}$ .

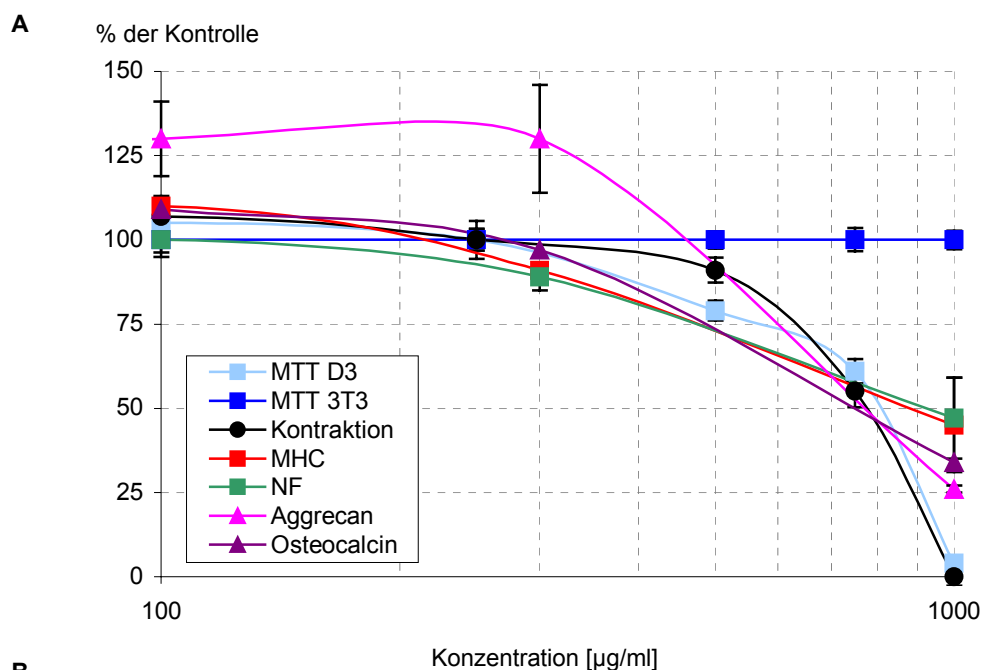


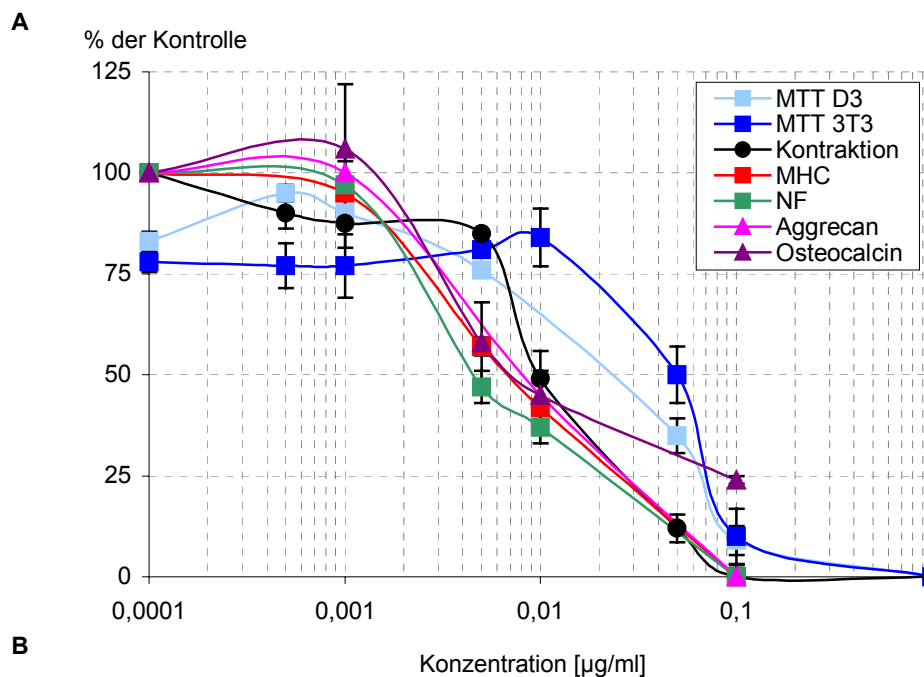
Abb. 37: (A). Konzentrations-Wirkungskurven für die sieben Endpunkte des erweiterten EST, dargestellt für Penicillin G. (B) Tabelle der aus den Kurvenverläufen durch Extrapolation ermittelten  $\text{IC}_{50}$  und  $\text{ID}_{50}$  Werte. Angaben in  $\mu\text{g/ml}$ .

Die Auswertung der Expression des Aggre Cangens zeigt, dass Penicillin G in einem Konzentrationsbereich zwischen 100-300  $\mu\text{g/ml}$  keine Auswirkungen auf die Entwicklung der Knorpelzellen hat. Die etwas erhöhte Expression des Aggre Cangens unter Einfluss von Penicillin G war hier nicht signifikant. Der ermittelte  $\text{ID}_{50}\text{KP}$  für Knorpelgewebe lag bei 780  $\mu\text{g/ml}$ , entsprach

somit dem  $IC_{50}MTTD_3$  und dem  $ID_{50}K$ . Auch der Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve für den Endpunkt Knochen ähnelt den bisher beschriebenen. Der ermittelte  $ID_{50}KN$  liegt zwar mit 730  $\mu\text{g}/\text{ml}$  etwas niedriger als die anderen, unterscheidet sich dennoch nicht sehr stark von den  $IC_{50}$  und  $ID_{50}$  Werten der anderen Endpunkte. Insgesamt ergab sich so kein Hinweis auf eine spezifische Entwicklungsstörung durch Penicillin G.

#### 4.5.1.2 5-Fluoruracil

5-Fluoruracil dient im EST als Positivkontrolle für Embryotoxizität. Aufgrund der hohen Zytotoxizität dieser Substanz lagen die gefundenen  $IC_{50}$  und  $ID_{50}$  alle in niedrigen Konzentrationsbereichen (Abb. 38). Am unempfindlichsten für 5-Fluoruracil waren die „erwachsenen“ 3T3 Zellen, die Empfindlichkeit der D<sub>3</sub> Zellen lag deutlich darunter. Auf Differenzierungsebene zeigte die klassische Auswertung, dass 5-Fluoruracil ein starkes Teratogen ist, da sich der  $IC_{50}MTTD_3$  und der  $IC_{50}K$  stärker voneinander unterscheiden als beim Penicillin G.



$IC_{50}MTT$ 3T3	$IC_{50}MTT$ D3	$ID_{50}K$ (Kontraktion) Herz	$ID_{50}H$ (MHC) Herz	$ID_{50}N$ (NF) Nerven	$ID_{50}KN$ (Osteocalcin) Knochen	$ID_{50}KP$ (Aggrecan) Knorpel
0,05	0,022	0,0097	0,0068	0,0044	0,0069	0,008

Abb. 38: (A). Konzentrations-Wirkungskurven für die sieben Endpunkte des erweiterten EST, dargestellt für 5-Fluoruracil. (B) Tabelle der aus den Kurvenverläufen durch Extrapolation ermittelten  $IC_{50}$  und  $ID_{50}$  Werte. Angaben in  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Ähnlich wie auch beim Penicillin G war die Auswertung auf der molekularen Ebene deutlich sensibler. Bei der getesteten Konzentration, bei der 5-Fluoruracil auf die Differenzierung erst eine Minderung auf 80% zeigt [0,005  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ], was auch als no-effect-level (NoEL) bezeichnet wird, ist



die MHC Expression schon auf 57%, die NFM Expression auf 47%, die Expression des Osteocalcins auf 58% und die Aggrecanexpression auf 63% abgesunken. Ein bestimmtes Zielorgan von 5-Fluoruracil kann aus diesen Werten nicht entnommen werden. Diese Testsubstanz wirkt auf die Entwicklung aller Organe und Zelltypen offenbar gleich embryotoxisch, da die  $ID_{50}$  Werte auf molekularer Ebene alle im gleichen Konzentrationsbereich von 0,0044-0,008 liegen.

#### 4.5.1.3 Retinolsäure

Die *in vivo* stark teratogene Retinolsäure zeigte im EST multiple Effekte (Abb. 39). Generell reagierten erneut die  $D_3$  Zellen eindeutig sensibler als die „erwachsenen“ 3T3 Zellen. Dennoch zeigten die sich in Differenzierung befindlichen Zellen während der Kultur eine nicht so starke Sensitivität wie die pluripotenten undifferenzierten ES Zellen. Sowohl der  $ID_{50}K$  als auch der  $IC_{50}H$  lagen bei höheren Konzentrationen als der  $IC_{50}MTTD_3$ .

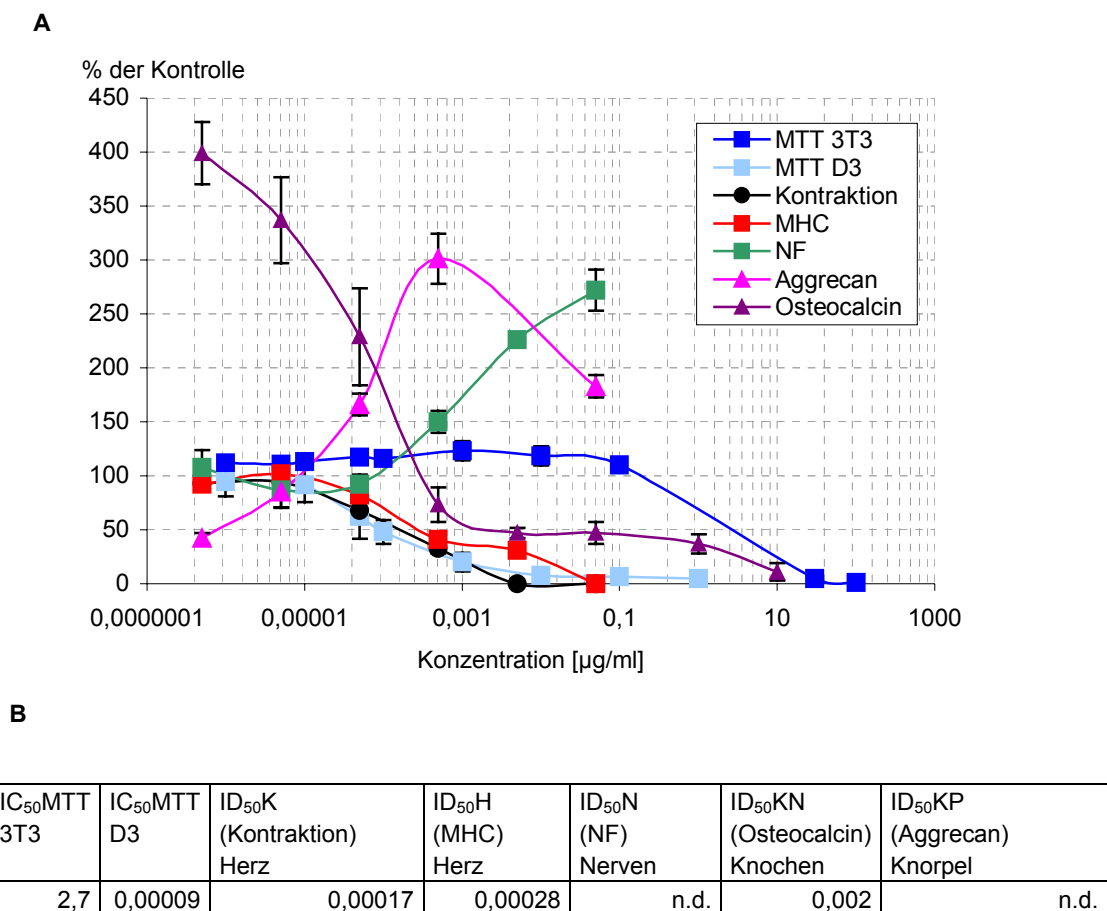


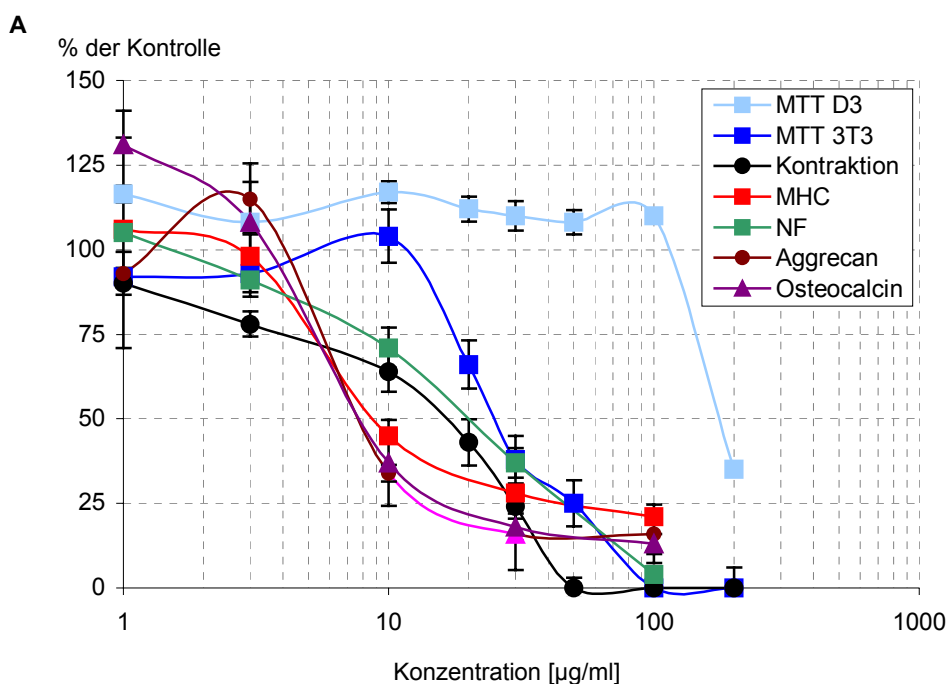
Abb. 39: (A). Konzentrations-Wirkungskurven für die sieben Endpunkte des erweiterten EST, dargestellt für Retinolsäure. (B) Tabelle der aus den Kurvenverläufen durch Extrapolation ermittelten  $IC_{50}$  und  $ID_{50}$  Werte. Angaben in  $\mu\text{g/ml}$ , n.d. = nicht determinierbar.

Ganz anders verhielten sich die Osteocalcin, die Aggrecan und die NFM Expressionen. Die niedrigste untersuchte Konzentration von Retinolsäure induzierte die Transkription des Osteocalcin Gens um das 4-fache der unbehandelten Kontrolle. Erst ab einer Konzentration von  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  sank die Osteocalcinexpression unter die Kontrollwerte. Der ermittelte  $\text{ID}_{50}\text{KN}$  lag mit  $0,002 \mu\text{g/ml}$  deshalb bei einer weitaus höheren Konzentration als der  $\text{ID}_{50}\text{H}$ . Die Aggrecanexpression lag bei der kleinsten untersuchten Konzentration von  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$  zwar schon bei 42% der unbehandelten Kontrolle, stieg dann aber auf beachtliche 300%, was einem Induktionsfaktor von 3 entspricht. Im untersuchten Konzentrationsbereich ist Retinolsäure deshalb ein Differenzierungsinduktor für Chondrozyten.

Auch Nervenzellen lassen sich durch Retinolsäure induzieren (4.3.2.), weshalb Retinolsäure auch in vielen Differenzierungsprotokollen zur neuronalen Entwicklung benutzt wird. Der EST unterstreicht diesen Effekt, allerdings nur bei Untersuchung des Endpunktes Nervenzellen. Die Induktion lag 275% über der unbehandelten Kontrolle bei einer Retinolsäurekonzentration von  $0,05 \mu\text{g/ml}$ . Für die Endpunkte Knorpel, Knochen und Nerven lassen sich deshalb hier keine  $\text{ID}_{50}$  Werte ableiten. Da zur Errechnung der Variablen für die Auswertung im Diskriminanzanalyseverfahren jedoch die  $\text{ID}_{50}$  Werte benötigt werden, wurde durch Interpolation der Kurven als fiktiver Wert  $5 \mu\text{g/ml}$  festgesetzt. Insgesamt zeigte sich bei Retinolsäure das Bild einer tiefgreifenden Differenzierungsstörung bei der Mehrzahl der untersuchten Endpunkte.

#### 4.5.1.4 Diphenylhydantoin

Das Antiepileptikum Diphenylhydantoin zeigt *in vivo* ein schwaches teratogenes Potential. Unter Diphenylhydantoinbehandlung zeigten die 3T3 Zellen entgegengesetzt den Erwartungen eine größere Sensitivität als die embryonalen  $\text{D}_3$  Zellen (Abb. 40).



**B**

IC <sub>50</sub> MTT 3T3	IC <sub>50</sub> MTT D3	ID <sub>50</sub> K (Kontraktion) Herz	ID <sub>50</sub> H (MHC) Herz	ID <sub>50</sub> N (NF) Nerven	ID <sub>50</sub> KN (Osteocalcin) Knochen	ID <sub>50</sub> KP (Aggrecan) Knorpel
23	180	17	8,7	20	7,6	7,5

Abb. 40: (A). Konzentrations-Wirkungskurven für die sieben Endpunkte des erweiterten EST, dargestellt für Diphenylhydantoin. (B) Tabelle der aus den Kurvenverläufen durch Extrapolation ermittelten IC<sub>50</sub> und ID<sub>50</sub> Werte. Angaben in µg/ml.

Sie lag immerhin um eine ganze Potenz verschoben. Dennoch reagieren die differenzierenden Zellen im Gegensatz zu ihren pluripotenten Stammzellen empfindlicher auf Diphenylhydantoin.

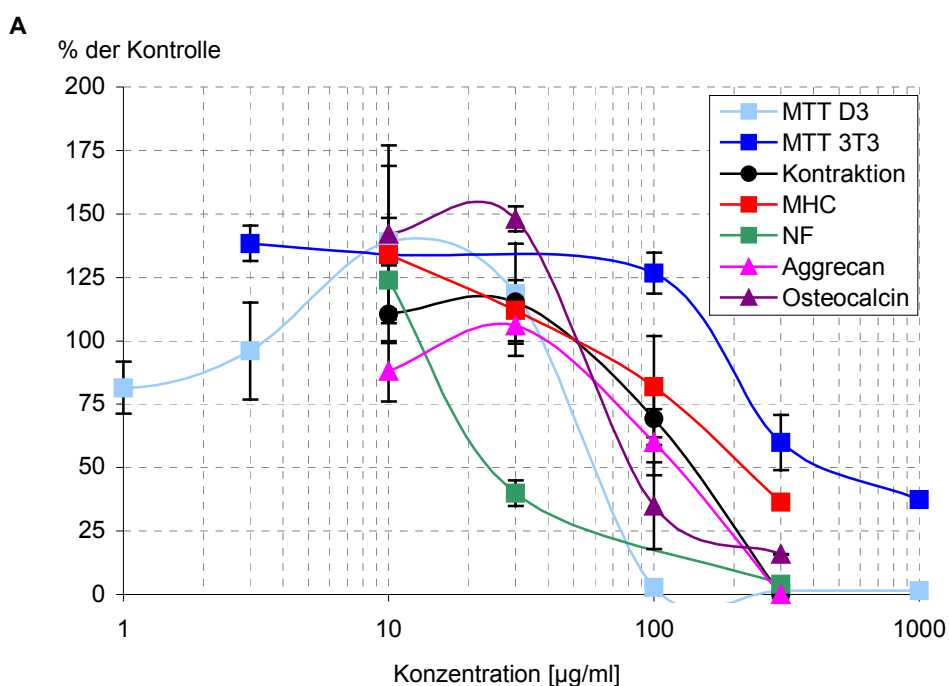
Die ID<sub>50</sub>H, ID<sub>50</sub>KN und ID<sub>50</sub>KP Werte, ermittelt über die Expression des MHC, des Osteocalcin sowie des Aggrecangens, lagen bei niedrigeren Konzentrationen als der ID<sub>50</sub>K.

Mit den kleinsten ermittelten ID<sub>50</sub> ergaben sich eindeutig die skelettalen Elemente, die Osteoblasten und Chondrozyten, als Zielorgan des Diphenylhydantoin. Einzig der Endpunkt Nerven erwies sich als weniger sensitiv als die Auswertung über die Kontraktionszählung.

#### 4.5.1.5 Valproinsäure

Auch Valproinsäure (VPA) wird therapeutisch als Antiepileptikum eingesetzt. Es hat wie Diphenylhydantoin schwach teratogenes *in vivo* Potential.

Unter VPA Applikation verhalten sich die D<sub>3</sub> Zellen wiederum sensibler als die 3T3 Zellen (Abb. 41). Die Auszählung der schlagenden EBs ist allerdings unempfindlicher als der MTT-Test an D<sub>3</sub> Zellen.



**B**

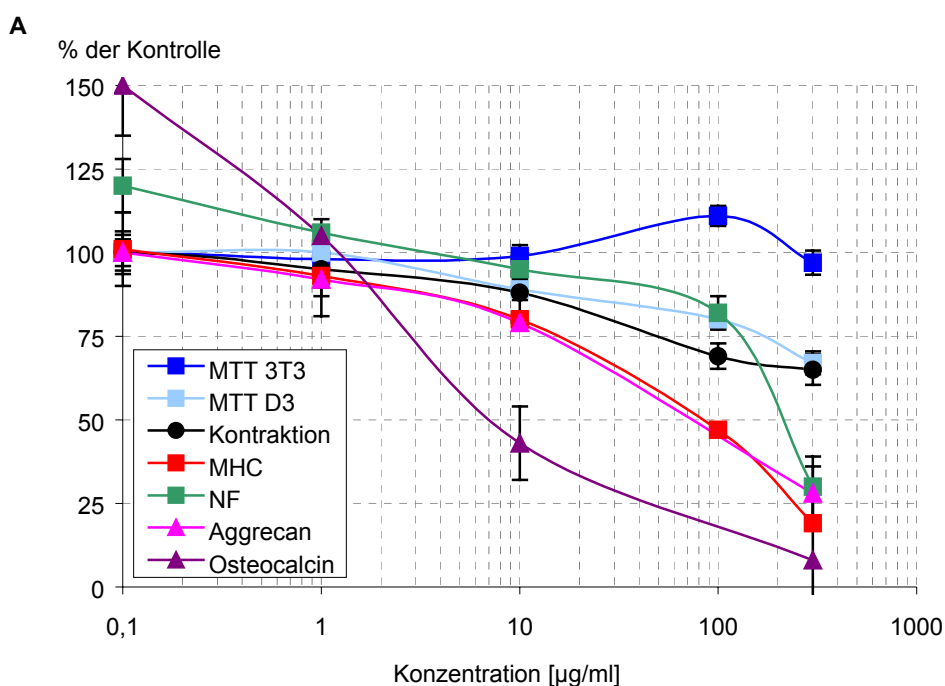
IC <sub>50</sub> MTT 3T3	IC <sub>50</sub> MTT D3	ID <sub>50</sub> K (Kontraktion) Herz	ID <sub>50</sub> H (MHC) Herz	ID <sub>50</sub> N (NF) Nerven	ID <sub>50</sub> KN (Osteocalcin) Knochen	ID <sub>50</sub> KP (Aggrecan) Knorpel
400	60	120	205	23	81	110

Abb. 41: (A). Konzentrations-Wirkungskurven für die sieben Endpunkte des erweiterten EST, dargestellt für VPA. (B) Tabelle der aus den Kurvenverläufen durch Extrapolation ermittelten IC<sub>50</sub> und ID<sub>50</sub> Werte. Angaben in µg/ml.

Auch die Bestimmung der Markergenexpression für den Endpunkt Herz, Knochen und Knorpel zeigte sich nicht so sensitiv wie die Zytotoxizität bestimmt an D<sub>3</sub> Zellen. Das Zielorgan für die Valproinsäure sind die Nervenzellen, da ihre Entwicklung von dieser Substanz massiv gestört wird. Die Nerven sind der einzige Endpunkt, bei dem der bestimmte ID<sub>50</sub>N unter dem IC<sub>50</sub>MTTD<sub>3</sub> liegt.

#### 4.5.1.6 Thalidomid

Thalidomid ist *in vivo* beim Menschen als Teratogen bekannt, nicht aber bei der Maus. Auf murine embryonale D<sub>3</sub> Zellen wirkt Thalidomid jedoch, wie es bei den meisten Substanzen der Fall ist, stärker als auf 3T3 Zellen (Abb. 42). Ab einer Konzentration von mehr als 300 µg/ml fällt Thalidomid im Medium aus. Die Halbhemmkonzentrationen der Zytotoxizität an D<sub>3</sub> Zellen und der Kontraktionsauswertung konnten deshalb nicht determiniert werden. Soweit zu urteilen, unterschied sich die Differenzierungsinhibition der Kardiomyozyten auf makroskopischer Ebene (Kontraktion) jedoch nicht wesentlich von der Zytotoxizität an den Stammzellen. Bei 300 µg/ml wurden Werte bestimmt, die für beide bei 68% der Kontrolle lagen.



**B**

IC <sub>50</sub> MTT 3T3	IC <sub>50</sub> MTT D3	ID <sub>50</sub> K (Kontraktion) Herz	ID <sub>50</sub> H (MHC) Herz	ID <sub>50</sub> N (NF) Nerven	ID <sub>50</sub> KN (Osteocalcin) Knochen	ID <sub>50</sub> KP (Aggrecan) Knorpel
>300	>300	>300	77	205	7	84

Abb. 42: (A). Konzentrations-Wirkungskurven für die sieben Endpunkte des erweiterten EST, dargestellt für Thalidomid. (B) Tabelle der aus den Kurvenverläufen durch Extrapolation ermittelten IC<sub>50</sub> und ID<sub>50</sub> Werte. Angaben in µg/ml.

Die Übertragung auf die molekulare Ebene enthüllt aber das teratogene Potential von Thalidomid auch auf murinen Zellen. Der ID<sub>50</sub>H liegt bei 77 µg/ml, die gesamte Kurve der MHC Expression ist gegenüber der Kontraktionsauszählung und der Zytotoxizität an D<sub>3</sub> Zellen in niedrigere Konzentrationsbereiche verschoben. Auch die Aggrecanexpression wird im gleichen Konzentrationsbereich zu 50% gehemmt [84 µg/ml]. Nervenzellen reagieren nicht so empfindlich auf Thalidomid, der ID<sub>50</sub>N lag bei 205 µg/ml.

Die Konzentrations-Wirkungskurve für den Endpunkt Knochen ist im Vergleich zu allen anderen deutlich nach links verschoben. Thalidomid scheint schon in kleinen Dosen embryotoxische Effekte bei Osteoblasten herbeizuführen. Der extrapolierte ID<sub>50</sub>KN lag bei 7 µg/ml.

#### **4.5.2 Klassifizierung der Substanzen nach ihrem teratogenen Potential**

##### **4.5.2.1 Diskriminanzanalyse – drei Klassen der Embryotoxizität**

Die aus den Konzentrations-Wirkungskurven über Interpolation ermittelten IC<sub>50</sub> und ID<sub>50</sub> Werte wurden in das auf Diskriminanzanalyse basierenden Klassifizierungsmodell nach Spielmann et al. (1997, siehe auch 3.9.1.) eingesetzt und die verschiedenen Variablen errechnet. Der ID<sub>50</sub> Wert im klassischen Modell wurde bei Auswertung der molekularen Endpunkte entsprechend mit den ID<sub>50</sub>H, ID<sub>50</sub>N, ID<sub>50</sub>KN oder ID<sub>50</sub>KP ersetzt. Der Vergleich der errechneten Variablen ergab schließlich die jeweilige Zuordnung zum *in vivo* Potential. Die Klassifizierung der Testsubstanzen wird aus Tabelle 4 ersichtlich. Im Vergleich zum klassischen Modell wurden alle Substanzen in allen untersuchten Endpunkten entsprechend ihrem *in vivo* teratogenen Potential korrekt klassifiziert. Jedoch muß hier einschränkend bemerkt werden, dass sowohl bei Einführung neuer Endpunkte als auch bei Verwendung empfindlicherer Marker ein neues Prädiktionsmodell über Diskriminanzanalyse errechnet werden müsste. Dies war im Zuge dieser Arbeit nicht möglich. Die errechneten Klassifizierungen dienen hier nur zur Orientierung.

**Penicillin G – nicht embryotoxisch, *in vivo* Klasse I**

	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Klasse
Kontraktion	1085,97	422,40	-312,11	I
Herz	1581,29	612,14	-452,11	I
Nerven	1616,67	625,70	-462,11	I
Knochen	1298,25	503,72	-372,11	I
Knorpel	1386,70	537,60	-397,11	I

**5-Fluoruracil - stark embryotoxisch, *in vivo* Klasse III**

	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Klasse
Kontraktion	-33,50	-17,21	1,88	III
Herz	-33,80	-17,32	1,97	III
Nerven	-34,06	-17,42	2,04	III
Knochen	-33,79	-17,32	1,96	III
Knorpel	-33,25	-17,11	1,81	III

**Retinolsäure - stark embryotoxisch, *in vivo* Klasse III**

	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Klasse
Kontraktion	-32,63	-16,99	6,53	III
Herz	-32,63	-16,99	6,53	III
Nerven	-22,81	-13,23	3,75	III
Knochen	-32,63	-16,99	6,53	III
Knorpel	-22,81	-13,23	3,75	III

**Diphenylhydantoin - schwach embryotoxisch, *in vivo* Klasse II**

	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Klasse
Kontraktion	-1,16	2,99	-6,77	II
Herz	-3,07	2,26	-6,23	II
Nerven	-0,46	3,26	-6,97	II
Knochen	-3,32	2,16	-6,16	II
Knorpel	-3,35	2,15	-6,15	II

**Valproinsäure - schwach embryotoxisch, *in vivo* Klasse II**

	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Klasse
Kontraktion	2,18	5,48	-5,35	II
Herz	3,31	5,92	-5,67	II
Nerven	0,89	4,99	-4,99	II
Knochen	1,66	5,29	-5,21	II
Knorpel	2,05	5,43	-5,32	II

**Thalidomid - schwach embryotoxisch, *in vivo* Klasse II**

	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Klasse
Kontraktion	7,60	8,12	-7,73	II
Herz	3,66	6,61	-6,61	II
Nerven	5,92	7,48	-7,25	II
Knochen	2,42	6,14	-6,26	II
Knorpel	3,78	6,66	-6,65	II

Tab. 4: Klassifizierung der Testsubstanzen auf Basis der Diskriminanzanalyse nach Spielmann et al. (1997).

#### 4.5.2.2 Ursprungsgerade – zwei Klassen der Embryotoxizität

Die Auswertung auf Basis der Gegenüberstellung der  $IC_{50}$  Werte der Zytotoxizität der  $D_3$  Zellen  $IC_{50}MTTD_3$  mit der klassischen Auszählung der Kontraktionen  $ID_{50}K$  bzw. der MHC Expression  $ID_{50}H$ , der NFM Expression  $ID_{50}N$ , der für die Nervenentwicklung steht, der Aggrecanexpression  $ID_{50}KP$  oder der Expression des Osteocalcingens für den Endpunkt Knochen  $ID_{50}KN$  erlaubt die Klassifizierung der untersuchten Substanzen in die zwei Klassen nicht teratogen und teratogen (Abb. 43). Die Ursprungsgerade teilt beide Klassen voneinander ab. Substanzen mit nicht teratogenem Potential erscheinen über oder auf der Linie. Hier liegen Zytotoxizität und Differenzierungsinhibition nahe beieinander,  $IC_{50}$  und  $ID_{50}$  ähneln sich, so dass das teratogene Potential der Substanzen weitgehend auf ihre allgemeine Zytotoxizität zurückgeführt werden kann. Alle Substanzen mit teratogenem Potential – unabhängig davon ob stark oder schwach embryotoxisch – befinden sich unterhalb der Ursprungsgeraden, da der  $IC_{50}MTTD_3$  in höheren Konzentrationsbereichen bestimmt wurde als die entsprechenden  $ID_{50}$  Werte. Die Störung der Differenzierung ist hier nicht nur auf die Zytotoxizität der Substanz begründet, sondern auf echte embryotoxische Effekte, die nicht nur die Proliferation der Zellen hemmen, sondern ihre die Entwicklungsprozesse stören.

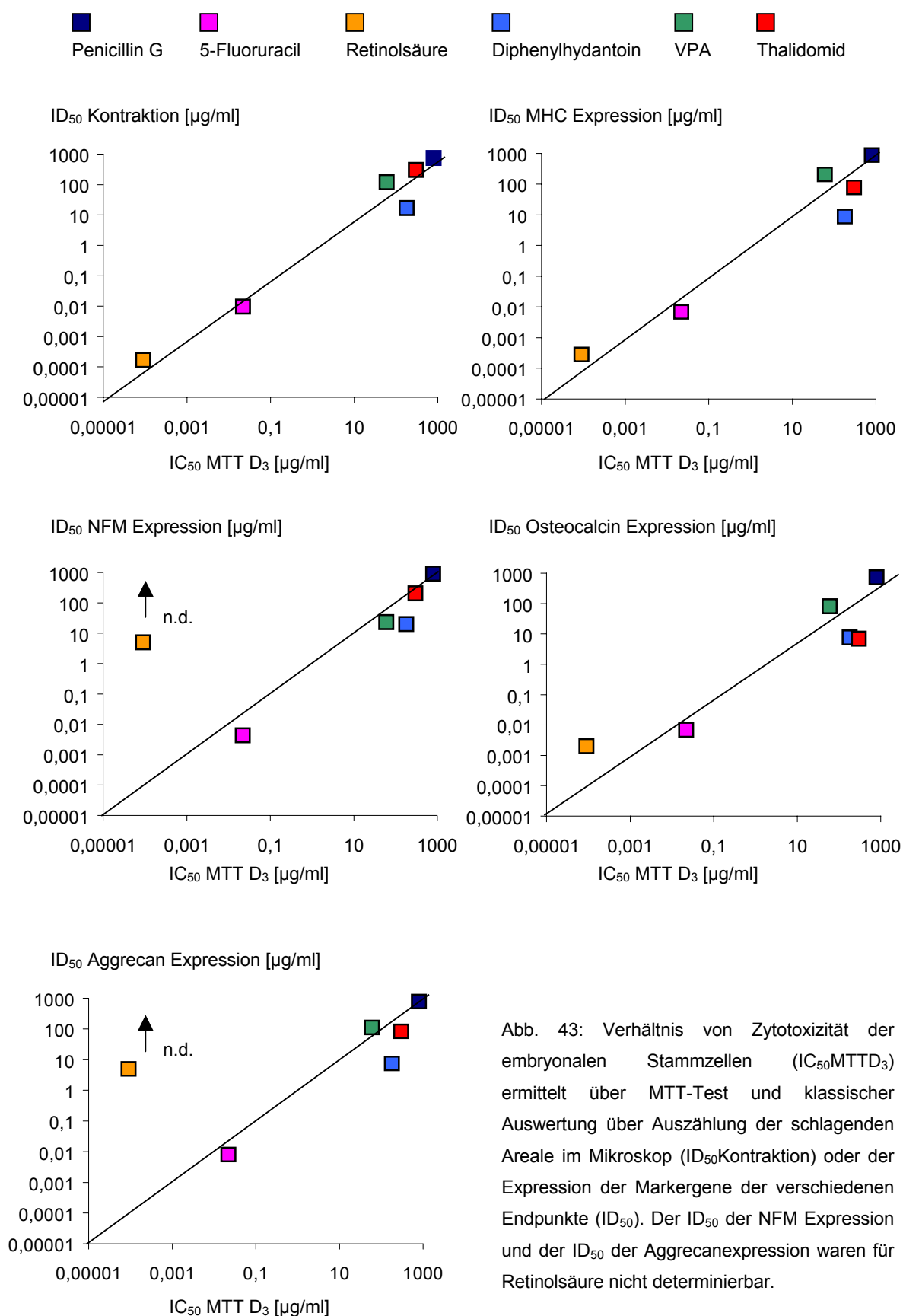
Interessant ist, dass bei dieser Darstellung das klassische Differenzierungsmodell einige Substanzen nicht entsprechend ihrem *in vivo* Potential zuordnet. Retinolsäure, VPA und auch Thalidomid wurden bei dieser Darstellung als nicht embryotoxisch eingeordnet. Erst bei Übertragung auf die molekulare Ebene wurden diese falsch negativen Substanzen korrekt klassifiziert. Retinolsäure nahm hier eine Sonderstellung ein, da im untersuchten Konzentrationsbereich keine Inhibierung der Differenzierung erfolgt.

Es zeigte sich im Gegenteil, dass Retinolsäure als Differenzierungsinduktor fungiert und die Expression einiger Markergene nicht herunter- sondern hochreguliert wird. Dies qualifiziert Retinolsäure aber nicht als nicht embryotoxisch, sondern im Gegenteil sollten alle Prozesse, die die Differenzierung in irgendeiner Form massiv stören, als embryotoxisch eingeordnet werden.

VPA wurde im klassischen Modell als nicht teratogen klassifiziert, und bei Übertragung auf die molekulare Ebene durch Analyse der MHC Expression wird sie ebenfalls als falsch negativ eingeordnet. Einzig im Endpunkt Nervendifferenzierung kamen seine teratogenen Eigenschaften zum Tragen. VPA trat dort unter die Linie und konnte nun korrekt zugeordnet werden.

Die Gegenüberstellung von Zytotoxizität und Differenzierungsinhibition erlaubt die Zuordnung eines bestimmten Zielorgans zur getesteten Substanz. Penicillin G und 5-Fluoruracil zeigen in jedem Endpunkt die gleiche Verteilung, denn die Differenzierung jeglicher Zellart wird von diesen beiden Substanzen gleichermaßen gestört. Retinolsäure dagegen stört die Differenzierung von Nervenzellen und skelettalen Elementen massiver als die der Kardiomyozyten. Diphenylhydantoin inhibiert die Entwicklung aller Endpunkte, am stärksten die Knorpeldifferenzierung, was an dem größeren Abstand zur Ursprungsgeraden im Endpunkt Knorpel ersichtlich wird. VPA hemmt nur

die Entwicklung neuronaler Zellen, andere Zelltypen werden nicht beeinflusst, denn nur im Endpunkt Nerven befindet sich VPA unterhalb der Ursprungsgeraden. Thalidomid wirkt auf die Differenzierung aller Organe.





## 5 Diskussion

Der Embryonale Stammzell Test (EST) vergleicht zwei wichtige Aspekte pränataler Toxizität (a) die Hemmung der Differenzierung der embryonalen Stammzellen und (b) die Sensitivitätsunterschiede zwischen embryonalen Zellen und „adulten“ Zellen, den Maus Fibroblasten, zur Bestimmung des teratogenen Potentials von Testsubstanzen.

Die Differenzierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen wurde im Labor etabliert und Differenzierungsprotokolle für Nervenzellen, Osteoblasten und Chondrozyten wurden als weitere Endpunkte für den EST erarbeitet.

Die Quantifizierbarkeit des klassischen EST gestaltete sich bisher vergleichsweise schwierig, weshalb die morphologische Auswertung schlagender Kardiomyozyten in der vorliegenden Arbeit durch die Expressionsanalyse von Markergenen ersetzt wurde. Auf Grund des pluripotenten Potentials *in vivo*, sind ES Zellen in der Lage *in vitro* in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, da sie viele Prozesse rekapitulieren, die während der Embryonalentwicklung stattfinden [Doetschmann et al., 1985]. Eine Kultur, die zu hundert Prozent aus einem einzigen Zelltyp besteht, zu differenzieren, ist fast unmöglich. In Folge dessen muß man in der Lage sein, distinkte Endpunkte eindeutig und unverwechselbar voneinander abzugrenzen. Dies wurde über die Bestimmung von Markergenen ermöglicht. Als Markergene wurden solche Gene definiert, die nur und ausschließlich von einem bestimmten Zelltypen exprimiert werden.

### 5.1 Kardiogenese

Immunhistochemisch wurde die Differenzierung pluripotenter ES Zellen in Kardiomyozyten nachgewiesen, die außerdem viele Haupteigenschaften des Säugerherzens exprimierten. Die herzspezifischen Proteine  $\alpha$ -Aktinin und MHC wurden spontan, also ohne Induktion über Medienadditive, von den differenzierenden EBs exprimiert (4.2.3.). Speziell das „Myosin Heavy Chain“ (MHC) korrespondiert mit schlagenden Herzzellen, die morphologisch im Mikroskop identifiziert werden konnten [Oyamada et al., 1996]. Etwa eine Woche nach dem Ausplattieren der EBs machte der Anteil der kontrahierenden Kardiomyozyten ungefähr 15-25% der gesamten Zellzahl im Embryoid Body aus. Dies bestätigt die bisher von anderen Arbeitsgruppen gefundenen Werte (10-30%) [Wobus et al., 1991]. Dieser Anteil wurde über Schätzung des Anteils der über die Antikörper gefärbten Zellen verifiziert. Die Frequenz der spontanen Kontraktionen der Kardiomyozyten fand an Tag 9 ihren Höhepunkt, doch die Anzahl der rhythmisch kontrahierenden Areale sank bereits beginnend mit Tag 10 der Kultur [Wobus et al., 1991; Metzger et al., 1995]. Auch die Größe der kontrahierenden Areale nahm mit zunehmender Kulturdauer wieder langsam ab [Wobus et al., 1991]. Ab der dritten Kulturwoche verschwanden die Kontraktionen ganz.

*In vivo* ist die Koexpression der MHC Gene charakteristisch für ventrikuläre und atriale Zellen während der frühen embryonalen Herzentwicklung [Lompre et al., 1984]. Die beginnende Expression des  $\alpha$ -MHC Gens repräsentiert *in vivo* den Zeitpunkt der Bildung atrialer Myozyten [Lyons et al., 1990]. Die Koexpression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -MHC Gene im EB verdeutlicht, dass die Prozesse der EB Differenzierung sich streng nach der *in vivo* Embryogenese richten. Bereits mit Tag 6 der Kultur, wenn die Expression der MHC Gene ansteigt, wurden demnach funktionierende Kardiomyozyten im EB gebildet. MHC Transkripte konnten zum gleichen Zeitpunkt auch von Oyamada et al. [1996] über RT-PCR nachgewiesen werden. Die Hauptexpressionszeit der MHC Isoformen lag bei Tag 8-9 der Kultur, ging jedoch parallel zu den mit der Abnahme der Kontraktionen im weiteren Verlauf der Kultur auf Basiswerte zurück.

Das MHC konnte über RT-PCR als herzspezifisches Markergen identifiziert werden, da es nur in kardialen Gewebe exprimiert wurde. Aktin kommt als Markergen nicht in Frage, da aus der Literatur bekannt ist, dass sowohl das kardiale wie auch skelettale  $\alpha$ -Aktin während der Embryonalentwicklung in Kardiomyozyten und Skelettmuskelzellen exprimiert wird [Sassoon et al., 1988]. Die Dauer des EST unter Verwendung der MHC Expression für den Endpunkt Herz verkürzte sich von Tag 10 (mikroskopische Auswertung im klassischen Modell) um zwei Tage auf Tag 8.

## **5.2 Neurogenese**

Differenzierungssysteme unter Verwendung embryonaler Stammzellen zur Generierung neuraler Zellen stellen ein überzeugendes Instrument bereit, mit dem man die Mechanismen, die die frühen Schritte der neuronalen Differenzierung kontrollieren, und die funktionellen Eigenschaften differenzierter Neurone, *in vitro* verstehen lernen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in Abhängigkeit der gewählten differenzierungsinduzierenden Faktoren und Protokolle verschiedene neuronale Zelltypen entstehen können [Okabe et al., 1996].

### **5.2.1 Identifizierung von Markergenen für neurale Zellen**

Mittels RT-PCR mit Primerpaaren für die in der Literatur beschriebenen neuronalen Gene und cDNA verschiedener Organe erwachsener Mäuse sollte untersucht werden, welche Gene spezifisch im Gehirn exprimiert werden, um Markergene für neuronale Zellen zu identifizieren.

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Nestin, das wie auch die NF Gene für ein intermediäres Filament neuronaler Zellen kodiert, ein besonderer Indikator für neurale Vorläuferzellen während der murinen ZNS Entwicklung ist. Nestin kam als Markergen jedoch nicht in Frage, da auch

Myoblasten und Kardiomyozyten während der Embryogenese Nestin exprimieren [Hockfield und McKay, 1985; Fraichard et al., 1995].

Der neuronale Transkriptionsfaktor Sox-2, ebenfalls in einer sehr frühen Phase der neuronalen Entwicklung *in vivo* exprimiert, konnte im Neuroektoderm des sich entwickelnden Embryos bereits ab Tag 8,5 p.c Embryos nachgewiesen werden [Collignon et al., 1996]. An Tag 12,5 p.c ließ sich über RT-PCR ein schwaches Amplicon detektieren (4.3.1.).

Neurone werden im zerebralen Kortex ab Tag 12 p.c. bis Tag 20 p.c. generiert [Bayer und Altman, 1991]. Die erste Expression von NFL koinzidiert mit dem Auftreten postmitotischer Neurone [Leconte et al., 1995]. NFM wird ebenso während der frühen Entwicklung postmitotischer neuronaler Zellen exprimiert, NFH dagegen erst signifikant später [Julien et al., 1986; Lieberburg et al., 1989]. Aus diesem Grund waren sowohl NFL wie auch NFM im 12,5 Tage alten Embryo exprimiert, nicht aber NFH.

MAP-2 Transkripte wurden von Lewis et al. (1986) exklusiv nur im Gehirn nachgewiesen. Mit MAP-2 Primern generierte Banden konnten in der vorliegenden Arbeit zwar primär im Gehirn und im Muskel gefunden werden, in anderen Geweben waren allerdings ebenfalls Banden von minimaler Intensität nachweisbar.

Während der Entwicklung steigt die Expression des Synaptophysin parallel zur Ausbildung von Synapsen [Calhoun et al., 1996; Masliah et al., 1990]. Synapsen treten gehäuft im Gehirn auf, weshalb die stärkste generierte Bande unter Verwendung von Gehirn cDNA auftrat. Da im Muskel über die neuromuskuläre Endplatten Reize über Synapsen übertragen werden, waren Synaptophysintranskripte auch im Muskel nachweisbar, sowie auch in geringeren Mengen in Leber und Niere.

Oligodendrozyten werden auf Proteinebene spezifisch vom O4-Antikörper identifiziert und Astrozyten vom GFAP- Antikörper [Schachner et al., 1981; Bignami et al., 1972]. Oligodendrozyten traten in der murinen Medulla einerseits erst an Tag 14,5 p.c. auf, sie wurden aber in murinen Gehirnen immunhistochemisch schon an Tag 12 p.c. nachgewiesen [Hardy et al., 1996; Wada et al., 2000]. Wir fanden oligodendrozytenspezifische Transkripte auf molekularer Ebene auch in 12,5 Tage alten Embryos, was die Ergebnisse von Wada et al. [2000] bestätigt. GFAP Transkripte können im Embryo erst an Tag 16 p.c. nachgewiesen werden und dann nur im Gehirn und in der Wirbelsäule [Laping et al., 1994]. Durch RT-PCR konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, denn GFAP war auf embryonaler cDNA nicht nachzuweisen. O4 und GFAP Transkripte waren spezifisch für Gehirngewebe.

Als Markergene konnten demnach alle drei Neurofilamente für Neuronen, das O4 für Oligodendrozyten und das GFAP für Astrozyten identifiziert werden.

Fast alle untersuchten Gene wurden auch in undifferenzierten ES Zellen exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nicht analysiert, ob diese vermehrt transkribierte mRNA auch in ein voll funktionsfähiges Protein translatiert wird. Aus der Literatur ist zumindest für das NSE Gen bekannt, das es eine vermehrte Expression in undifferenzierten ES Zellen zeigt die während der ersten sieben Tage der neuronalen Differenzierung herunterreguliert und anschließend erneut hochreguliert wurde. Das korrespondierende NSE Protein konnte während der ersten Expressionsphase jedoch nicht nachgewiesen werden [Alouani et al., 1993].

#### **5.2.1.1 Induktion der Neurogenese mit *all-trans* Retinolsäure**

Retinolsäure ist ein genereller Neuronen-induzierender Stoff. *In vivo* wird das Auswachsen von Neuriten aus der Wirbelsäule von Amphibien von Retinolsäure stimuliert [Maden und Holder, 1991]. Retinolsäure reguliert ebenso den Phänotyp postmitotischer Neurone *in vitro* und fördert die *in vitro* Differenzierung retinaler Vorläufer zu Photorezeptoren [Berrard et al., 1993; Kelley et al., 1994]. Retinolsäure fördert die Replikation und das Überleben multipotenter neuronaler Vorläuferzellen in Kultur und führt außerdem zu einer gesteigerten Anzahl differenzierender Neurone [Henion und Weston, 1994]. Es stimuliert ebenfalls die Regeneration von auditiven Haarsinneszellen, die nichts anderes darstellen als hochspezialisierte Neurone im Epithel der Cochlea [Lefebvre et al., 1993]. Letztendlich kann Retinolsäure die Differenzierung der embryonalen Karzinomazellen P19 entlang des neuronalen Weges induzieren [Jones-Villeneuve et al., 1982].

Etwa an Tag 9/10 der Kultur erscheinen Retinolsäure-induzierte Neurone zwar eher unreif, exprimieren aber dennoch Synaptophysin [Fraichard et al., 1995; Angelov et al., 1998]. Das Synaptophysin kann als verlässlicher Marker terminaler Nervenzelldifferenzierung angesehen werden, denn die immunpositiven Stellen korrespondieren mit den synaptischen Vesikeln [Knaus et al., 1986; Wiedenmann et al., 1985]. Immunhistochemisch ließen sich an Tag 11 alle untersuchten neuronalen Proteine nachweisen (4.3.2.1.). Sogar schon ab Tag 8 können Neurone über die Immunfärbung mit anti-MAP-2 oder anti-NF200 identifiziert werden [Fraichard et al., 1995]. Auf molekularer Ebene fanden NFL und NFM ihr Expressionsmaximum an Tag 11 (4.3.2.3.). Da die erste Expression von NFL mit dem Auftreten postmitotischer Neurone koinzidiert, bildeten sich die ersten funktionierenden Neurone ab Tag 6 der Kultur, denn die NFL Expression stieg an diesem Tag bereits über die Basisexpression [Leconte et al., 1995]. Korrelierend zu den *in vivo* Daten wird NFH zwar an Tag 11 auch exprimiert, seine Expression ist jedoch nicht so stark und findet ihr Maximum erst zum Ende der untersuchten Zeitspanne, also später als NFL und NFM. Die leichten Filamente sind in der Lage, alleine filamentöse Strukturen auszubilden, die mittleren jedoch nicht. Erst im Zusammenspiel mit NFL kann NFM intermediäre Filamente ausbilden [Gardner et al., 1984, Hisanaga und Hirokawa, 1990; Hirokawa, 1991]. Während der frühen Entwicklung werden die vorhandenen Neurofilamente aus NFL und NFM zusammengesetzt

und werden nach und nach von den Triplettneurofilamenten aus NFL, NFM und NFH abgelöst [Carden et al., 1985]. Die Anwesenheit von NFH könnte das Verlangsamen des axonalen zytoskelettalen Transports und das Wachstum des axonalen Durchmessers vermitteln, denn sein Auftreten fällt zeitlich mit der Stabilisierung der neuronalen Verschaltungen zusammen [Carden et al., 1985].

*In vitro* sind während der ersten zwei Wochen der EB- Differenzierung zwar nachweislich Marker reifer Neurone nachweisbar, Gliazellen dagegen scheinen noch nicht reif genug, ihre zellspezifischen Gene zu exprimieren, obwohl sie von denselben Vorläuferzellen abstammen wie Neurone [Fraichard et al., 1995]. Angelov et al. [1998] zeigten, dass zu späteren Phasen der EB Differenzierung (hier korrespondierend mit dem Ende der dritten Kulturwoche) auf etwa 4-7 Neuronensomata eine Astrozyte kam, die in gegenseitigem Kontakt zueinander standen. Oligodendrozyten hingegen entwickelten sich in Retinolsäure-induzierten EBs nur selten und waren nicht mit den NSE- positiven Neuronen assoziiert. Es mag deshalb geschlossen werden, dass, ähnlich wie *in vivo*, wo die Neuroblasten vor den Glioblasten entstehen, die Neurone im EB eher reifen als die Gliazellen und daher in der Lage zu sein scheinen, Ereignisse während der frühen Entwicklung des Nervensystems zu induzieren und auch zu kontrollieren [Fujit, 1963; Hinds, 1971]. Allerdings waren wir nicht in der Lage, immunhistochemisch Marker für Astrozyten an Tag 11 nachzuweisen, ein Zeitpunkt der Kultur, an dem neuronale Marker sowie auch oligodendrozytenspezifische Marker sowohl über Antikörper wie auch durch Expressionsanalyse nachweisbar waren. GFAP konnte allerdings an Tag 21 über Antikörper identifiziert werden [H. Spielmann, persönliche Mitteilung], ein Zeitpunkt der in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. Auf Expressionsebene war GFAP jedoch ab der ersten Woche ständig um den Faktor 2 gegenüber Kulturtag 5 erhöht.

Die molekularen Mechanismen, über die Retinolsäure während der Embryogenese *in vivo* wirkt, scheinen eine komplexe Signalkaskade zu involvieren. Die Mechanismen, über die Retinolsäure die Neurogenese induziert, sind deshalb noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Hypothese, dass die Signalkaskaden der *in vivo* und *in vitro* Differenzierung vergleichbar sind, wird unterstützt von der Tatsache, dass während der Retinolsäure-induzierten neuronalen Differenzierung muriner embryonaler Karzinomazellen die mRNA für die Retinolsäurerezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  signifikant hochreguliert, die mRNA für RAR $\gamma$  und RXR $\gamma$  dagegen schnell herunterreguliert werden [Jonk et al., 1992; Yokota und Ohkubo, 1996].

Viele der neuralspezifischen Gene, die *in vitro* während der von Retinolsäure induzierten neuronalen Entwicklung exprimiert werden, kodieren für Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle, wie Pax-6, MASH-1 und Wnt-1 [Gajovic et al., 1997; Bain et al., 1996]. Parallel dazu werden frühe mesodermale Genen wie *Brachyury*, kardiales Aktin und  $\zeta$ -Globin

herunterreguliert [Bain et al., 1996]. Unter Einfluss von Retinolsäure wird die neuronale Differenzierung also von einer Repression der mesodermalen Differenzierung begleitet. Die postinduktiven Kulturbedingungen fördern entweder das Überleben einer speziellen Klasse neuronaler Zellen oder aber bedingen die weitere Differenzierung der Zellen zu verschiedenen Neuronentypen [Dinsmore et al., 1998].

#### **5.2.1.2 Induktion der Neurogenese über Selektion**

Die Differenzierung in neuronale Zellen scheint ein Differenzierungsweg der ES Zellen zu sein, der spontan auftritt, aber offenbar unter der inhibitorischen Kontrolle einiger im Serum enthaltener Mesoderm induzierender Faktoren steht [Kramer et al., 2000]. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass ES Zellen proliferierende neuronale Vorläuferzellen generieren, die vermehrt werden können und letzten Endes sehr effizient zu synaptisch verschalteten Neuronen und Gliazellen ausdifferenzieren. Die Linienselektion wie man sie im sich entwickelnden Embryo vorfindet, läuft in diesem *in vitro* Kultursystem nach einem präzise determinierten Muster ab. Die Kombination aus serumfreien Medium und Wachstumsfaktoren grenzt die verschiedenen Stadien der Neurogenese voneinander ab. Dies sind der Status der Pluripotenz, die Phase der proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen und die finale Differenzierung in Neurone und Gliazellen. Die neuronalen Zellen erfüllen alle Kriterien postmitotischer Neurone. Sie entwickeln spezielle Strukturen wie Dendriten und Axone und kompartimentieren zytoskelettale Proteine zu spezifischen Regionen. Zudem exprimieren die Zellen eine ganze Bandbreite von Neurotransmittern, Transmitterrezeptoren und Ionenkanälen und es werden funktionelle synaptische Kontakte zwischen den Zellen aufgebaut [Guan et al., 2001].

Sogar in definierten Medien macht es die Präsenz der von den differenzierenden ES Zellen selbst synthetisierten Zytokine äußerst schwierig, die Rolle individueller Wachstumsfaktoren während der Linienselektion zu erfassen [Rolletschek et al., 2001]. Dennoch war zu erkennen, dass Transferrin und Fibronectin während der zweiten Phase der Linienselektion generelle Effekte auf die Überlebenschance aller Zellen zeigten, wohingegen Insulin speziell das Überleben neuronaler Vorläuferzellen sicherte [Okabe et al., 1996]. Auch auf andere Zellen ist der positive Effekt dieser Supplemente beschrieben worden. So werden serumfreie Mausembryozellen oder auch primäre murine neuronale Zellen unter Einfluss von Insulin, Transferrin und Fibronectin *in vitro* in Kultur gehalten [Sakai et al., 1990]. Selen im Kulturmedium ist ein essentielles Spurenelement, was für das normale Wachstum und die Funktion des Gehirns notwendig ist. Besonders wichtig ist es für die morphologische Entwicklung von Oligodendrozyten und ihr Überleben in Kultur [Gu et al., 1997].

Der Hauptzelltyp, der in der zweiten Phase in ITSFn Medium generiert wird (Tag 6-13 der Kultur), zeigt Eigenschaften neuronaler Vorläuferzellen. In der dritten Phase (Tag 14-21) beträgt der Anteil

neuraler Vorläufer, identifiziert über Immunfärbung gegen Nestin über 80% der gesamten Zellpopulation. Der andere Hauptzelltyp (10-15%) waren MAP-2-positive Zellen [Okabe et al., 1996], die zu diesem Zeitpunkt noch keine Neuriten aufwiesen. Der Anteil GFAP-positiver Zellen betrug etwa 2%. Die Zellen der zweiten Kulturphase zeigten allgemein ähnliche morphologische Eigenschaften wie native neuroepitheliale Vorläuferzellen [Collazo et al., 1992].

Während der dritten Phase des Selektionsprotokolls standen die Zellen unter dem Einfluss des bFGF. Im embryonalen Kortex exprimiert, reguliert bFGF *in vivo* die Zellproliferation und die Spezifizierung der Differenzierungsrichtung [Ghosh und Greenberg, 1995]. Murine Null-Mutanten des bFGF zeigen eine reduzierte Anzahl von Neuronen und Gliazellen [Vaccarino et al., 1999]. Die Proliferation und Differenzierung von O2A Vorläuferzellen, welche gemeinsame Vorläufer von Typ II Astrozyten und Oligodendrozyten sind, wird durch bFGF gefördert, was andererseits bedeutet, dass die Oligodendrozytendifferenzierung inhibiert wird [Bögler et al., 1990; McKinnon et al., 1990]. Der Prozess der Transformation proliferierender Zellen des Neuroektoderms zu differenzierten Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten wird während der *in vitro* Differenzierung der ES Zellen von bFGF ausgelöst, in dessen Anwesenheit die Zellen proliferieren und nach dessen Entzug sie differenzieren. *In vitro* wirkt bFGF generell als starkes Mitogen für neuroepitheliale Vorläuferzellen [Gensburger et al., 1987; Cattaneo und McKay, 1990; Kilpatrick und Bartlet, 1993; Ray et al., 1993; Vicario-Abejon et al., 1995]. Es induziert sowohl die Proliferation von Astrozyten, steigert aber auch die GFAP-Immunreaktivität im Gehirn neonataler Nager und der primären Astrozyten *in vitro* [Eclancher et al., 1990; Perraud et al., 1990]. Diese Effekte weisen dem bFGF eine Rolle in der reaktiven Gliose zu.

In der dritten Phase des Protokolls wird dem Medium zusätzlich Laminin zugesetzt, das als extrazelluläres Matrixmolekül das axonale Längenwachstum unterstützt [Lien et al., 1992]. Progesteron kann die Expression des GFAP Proteins steigern, nachgewiesen im Hippocampus der Ratte und wird außerdem zusammen mit Putrescin routinemäßig in der Kultur von Gehirnschnitten eingesetzt [Luquin et al., 1993; Wada et al., 2000].

In den von ES Zellen abstammenden Neuronen sind laut Literatur in der vierten Kulturphase MAP-2 positive Dendriten und NFM-positive Axone nachweisbar [Shaw et al., 1985; Caceres et al., 1984], was mit den spezifischen Antikörperfärbungen bestätigt werden konnte. Auch Synaptophysin, die anderen Neurofilamente und Marker für Oligodendrozyten und Astrozyten ließen sich an Tag 30 der Kultur über Antikörper nachweisen (4.3.3.1).

### **5.2.1.3 Vergleichende Analyse der Retinolsäure-induzierten Neurogenese und der Neurogenese über Selektion**

Die Vorteile des EB- Modells zur neuronalen Differenzierung gegenüber klassischen neuroanatomischen und neurophysiologischen Methoden liegen auf der Hand. Die Differenzierung in EBs beschleunigt die zelluläre Differenzierung und rekapituliert die gesamte Zeitspanne der neuronalen sowie gliären Histogenese innerhalb einiger weniger Tage. Das EB Modell der neuronalen Differenzierung gestattet den Nachweis aller behandlungsinduzierten Änderungen. Außerdem erlaubt die Beschaffenheit des EBs eine genau detaillierte mikroskopische Analyse des neuronalen Netzwerks und anhängender Gliazellen ohne Sektion des Gewebes.

Interessanterweise arbeiten die verwendeten Differenzierungsprotokolle nicht mit der gleichen Effizienz. Weder in undifferenzierten noch von Retinolsäure induzierten ES Zellen konnten Transkripte des Transkriptionsfaktors BF-1, der selektiv in vorderen Regionen des Nervensystems exprimiert wird, nachgewiesen werden [Rolletschek et al., 2001]. Die Anwesenheit sowohl anteriorer wie auch posteriorer Marker in der Population der nestinpositiven Zellen differenziert über Linienselektion jedoch zeigt, dass das Modell ohne Retinolsäure in der Lage ist, Neurone aus vorderen und hinteren Hirnregionen zu differenzieren [Okabe et al., 1996]. Auch bFGF ist bekannt dafür, dass es eine Rolle bei der Bildung posteriorer neuronaler Strukturen spielt [Doniach, 1995].

In Retinolsäure induzierten EBs bildet zwar eine Subpopulation der Zellen funktionelle synaptische Verbindungen, der Anteil dieser Zellen ist jedoch relativ klein. Die Differenzierung von Neuronen und Gliazellen ist hier abhängig vom Serum. Im Selektionsmodell sind über 95% der Zellen während der proliferativen Phase neuronale Vorläuferzellen. Die mit neuronalen Zellen hoch angereicherte Zellpopulation in serumfreien Medium erlaubt die biochemische Analyse von Signalmechanismen über Wachstumsfaktor- oder Neurotransmitterrezeptoren.

Es ist bekannt, dass die Bildung oligodendrozytischer Vorläufer während der Entwicklung simultan oder direkt nach der Anlage der ersten Neurone geschieht [Wada et al., 2000]. Die dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Entwicklung von Oligodendrozyten derer der Astrozyten vorausgeht. Beide Protokolle induzierten zuerst die oligodendrozytenspezifischen Gene, Astrozyten waren entweder in der gewählten Kulturperiode überhaupt nicht nachzuweisen (Retinolsäure), oder erst in einer späteren Phase der Kultur (Linienselektion).

Anhand der dargelegten Gründe wird ersichtlich, dass die Linienselektion der Differenzierung über Retinolsäure Vorteile mit sich bringt. Die über Linienselektion induzierten Vorläuferzellen zeigen ein inhärentes Potential in jeden neuronalen Zelltypen differenzieren zu können. Dennoch sollte bei Verwendung des Endpunktes Nerven für den EST nur die neuronale Differenzierung betrachtet werden, um die Testdauer so kurz wie möglich zu halten. Die NF Gene zeigen ihre höchste Expression bereits an Tag 14, so dass der Test bereits zu diesem Tag ausgewertet werden könnte.



### **5.3 Entwicklung skelettaler Elemente aus embryonalen Stammzellen**

Auf die Differenzierung von chondrogenen und osteogenen Zellen fokussierte Studien verwendeten bisher primäre Kulturen, Karzinomazelllinien und mesenchymale Zellen [Ahrens et al., 1993; Mackay et al., 1998; Laitinen et al., 1999; Lou et al., 1999]. Diese *in vitro* Zellsysteme sind auf Zellen beschränkt, die von adulten oder embryonalen Geweben stammen, die jedoch bereits differenzierte Zellen oder Zellen, deren Differenzierungsweg schon festgelegt ist, enthalten. Deshalb war die Analyse der Differenzierungsprozesse bisher auf relativ späte Stadien der Entwicklung beschränkt [Castagnola et al., 1988; Bruckner et al., 1989; Galotto et al., 1994]. Im Gegensatz dazu beinhaltet das ES Zellmodell alle Stadien der Entwicklung, angefangen bei den pluripotenten Zellen über die mesenchymale Kondensation bis zur terminalen Differenzierung zu den entsprechenden Zellen und rekapituliert deshalb die *in vivo* Entwicklungsprozesse.

#### **5.3.1 Osteogenese in Embryoid Bodies**

##### **5.3.1.1 Identifizierung von Markergenen für Osteoblasten**

Die Bestimmung der Markergene zur eindeutigen Charakterisierung der Osteoblasten fand mittels RT-PCR statt. Es wurden Primersequenzen für die entsprechenden aus der Literatur bekannten im Knochengewebe exprimierten Gene generiert und auf ihre Fähigkeit hin, ihr spezifisches Transkript in verschiedenen Organen nachzuweisen, getestet.

Die Kollagen Typ I, ALP und Osteonectin wiesen zwar die höchste Expression in Knochengewebe auf, kamen aber auch in anderen Organen vor.

Übereinstimmend mit der Literatur wurde Osteopontin in den verschiedensten Geweben nachgewiesen. Die stärkste Expression tritt in der Niere auf, denn Osteopontin wird hauptsächlich von Nierenzellen und Osteoblasten synthetisiert [Rittling et al., 1998]. In geringeren Mengen kommt Osteopontin aber auch in einer Reihe anderer Gewebe vor, wie Darm, Innenohr, Plazenta, diversen epithelialen Oberflächen, Chondrozyten in diversen Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin, Galle und Milch [Butler, 1989; Castagnola et al., 1991; Franzen und Heinegard, 1985; Oldberg et al., 1986; Rodan, 1995; Denhardt et al., 1993; Giachelli et al., 1995; Butler et al., 1996]. Bei Ratten kommt Osteopontin auch im Nervensystem, dem Gehirnstamm und dem Zerebellum vor, wo es in den Neuronen den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel reguliert [Lee et al., 2001; Loez et al., 1995].

Kollagen Typ I mRNA wird in ossifizierten Knochen exprimiert und außerdem in der Haut und den peritonealen Membranen der inneren Organe [Cheah et al., 1991]. Deshalb findet man im Einklang mit diesen Ergebnissen entsprechende Signale in vielen Organen wie Herz, Niere und Lunge (4.4.1.2.).

Alkalische Phosphatase ist hauptsächlich in der Zellmembran vieler Gewebe vorhanden. Man unterscheidet jedoch mehrere Typen, zum einen TNS-ALP (Tissue nonspecific, nicht

gewebespezifisch), intestinale und plazentale ALP. Die TNS-ALP ist diejenige, deren Isoenzyme in Knochen, Leber, Niere und anderen Organen exprimiert werden [Gosecki-Sone et al., 1999]. Die für diese Studie generierten Primerpaare für ALP zeigten nur ein Transkript in Knochen-, Knorpel- und Lungengewebe, nicht aber in der Leber, ist deshalb knochenspezifisch.

Das Phosphoprotein Osteonectin ist auch in einigen anderen Geweben und Zelltypen außer im Knochen vorhanden, wie Odontoblasten, Hirnanhangdrüse, interstitielle Zellen der Hoden und Eierstock [Nomura et al., 1988; Holland et al., 1987]. Die Gen- und Proteinexpression des Osteonectins sind auch für Chondrozyten beschrieben worden, die nicht der Kalzifizierung unterliegen [Nakase et al., 1994; Chen et al., 1991]. Ein Osteonectinsignal konnte tatsächlich auf Chondrozyten cDNA gezeigt werden. Während das Osteonectin im Knochen für die Knochenbildung verantwortlich ist, könnte es im Knorpel in Funktionen wie Zellzyklusregulation und Formmodulation involviert sein [Termine und Robey, 1996].

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Genen war die Expression des Cbfa1, des Bone Sialoproteins und des Osteocalcins auf Knochengewebe limitiert.

Die Cbfa1 Expression zeigt bei Untersuchung der adulten Gewebe eine Begrenzung auf die Osteoblasten. Aus der Literatur ist bekannt, dass es ebenso in Odontoblasten, den Dentin synthetisierenden Zahnhomologen der Osteoblasten exprimiert wird, was hier nicht untersucht wurde [D'Souza et al., 1999]. Als Markergen für die spezifische Differenzierung zu Osteoblasten kommt Cbfa1 nicht in Frage, da es in der Embryonalentwicklung in mesenchymalen Stammzellen exprimiert wird, die sowohl zu Knochen- wie auch zu Knorpelzellen ausdifferenzieren [Ducy et al., 1997]. Neueste Studien zeigen, dass die Cbfa1 Expression nicht unbedingt auf ausdifferenzierte Osteoblasten limitiert sein muß, sondern dass Cbfa1 auch von hypertrophen Chondrozyten exprimiert werden kann [Kim et al., 1999; Enomoto et al., 2000]. Allerdings ist diese im Knorpel vorkommende Cbfa1 Variante eine alternativ gespleißte Isoform des Cbfa1 Gens, deren Transkription im zweiten Exon startet (Typ I Cbfa1 oder Pebp2 $\alpha$ A). Mit den hier generierten Primern jedoch war nur die knochenspezifische Isoform nachzuweisen (Osf2/Cbfa1), die im ersten Exon startet.

Mit Einschränkung konnte das Bone Sialoprotein als Markergen identifiziert werden. Es ist primär in Osteoblasten lokalisiert (4.4.1.2.), wurde aber auch in von anderen Arbeitsgruppen in Thrombozyten und Tumorzellen identifiziert [Davies, 1996]. Die Differenzierung von Thrombozyten aus den embryonalen Stammzellen ist bisher noch nicht beschrieben worden. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass sich spontan auch diese Untergruppe hämatopoetischer Zellen bildet. Die spontane Differenzierung zu Erythrozyten und Lymphozyten jedenfalls ist bekannt [Wiles und Keller, 1991; Keller et al., 1993; Cho et al., 1999].

Auf Grund der ermittelten oder in der Literatur bekannten Expression der beschriebenen Gene in anderen Organen als Knochen, kam nur das Osteocalcin als Markergen in Frage, denn seine

Expression ist streng auf Knochengewebe begrenzt. Osteocalcin ist in der Literatur außerdem als einziges osteoblastenspezifisches Protein beschrieben [Hauschka et al., 1989].

### 5.3.1.2 Einfluss der Medienzusätze auf die Osteogenese

Vergleichbar mit primär isolierten Osteovorläuferzellen verschiedener Spezies in Kultur, bilden ES Zellen ebenso eine mineralisierte Knochenmatrix *in vitro*, wenn sie unter Kulturbedingungen gehalten werden, die eine Deposition von extrazellulären Matrixmolekülen favorisieren [zur Nieden et al., 2002; Gerstenfeld et al., 1987; Aronow et al., 1990; Ecarot-Charrier et al., 1983; Stein et al., 1989]. Das Netzwerk aus nicht-osteoblastischen Zellen im Knochenmark, das unter den meisten *in vitro* Bedingungen nicht vorhanden ist, sorgt nicht nur für die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren, die für die Stimulation der Osteogenese benötigt werden, sondern auch für den Stimulus der Zell-Zell-Kontakte [Schmitz et al., 1995].

Unter *in vitro* Bedingungen benötigt die Osteoblastendifferenzierung die Zugabe spezifischer Osteoinduktoren, die mit den physiologischen Regulatoren der Knochenbildung *in vivo* nicht verwandt sein müssen [Aronow et al., 1990].

Die Supplemente Ascorbinsäure,  $\beta$ -Glycerophosphat und  $VD_3$  ändern den Differenzierungsweg, der in ES Zellen spontan auftritt, wie mit dem differentiellen Expressionsmuster des Oct4 in supplementierten Kulturen gezeigt wurde (4.4.1.3.3.). Dieser neue Differenzierungsweg wurde durch biochemische und molekulare Methoden als ein Differenzierungsweg identifiziert, dessen Ziel die Ausbildung funktioneller Osteoblasten ist (4.4.1.1., 4.4.1.3.2., 4.4.1.3.3.). Abbildung 44 veranschaulicht den Einfluss der verwendeten Medienadditive auf die knochenspezifischen Marker.

Ascorbinsäuremangel reduziert *in vivo* die Knochenbildung im allgemeinen wie auch die Osteoblastendifferenzierung im besonderen, was sich in der Reduktion der Expression von mRNAs der Osteoblastenmarker Osteocalcin und alkalischer Phosphatase äußert [Mahmoodian et al., 1996].

*In vitro* gilt Ascorbinsäure als Induktor der Osteogenese, indem es die Kalzium- und Matrixdeposition sowie die Bildung mineralisierter Aggregate etwa in murinen C1, MC3T3-E1 Zellen oder ST2 Stromazellen fördert [Chentoufi et al., 1993; Franceschi und Iyer, 1992; Otsuka et al., 1999]. Die Hemmung der Kollagensynthese in Abwesenheit von Ascorbinsäure blockiert die Osteoblastendifferenzierung *in vitro*, denn die Matrixformation vermittelt vom Kollagen Typ I scheint für die Induktion der Differenzierung essentiell zu sein [Gerstenfeld et al., 1987].

Ascorbinsäure induziert auch die ALP Aktivität in ST2 Zellen und reguliert die mRNA der ALP in MC3T3-E1 Zellen hoch [Chentoufi et al., 1993; Otsuka et al., 1999].



wird das Osteopontin Gen vermehrt transkribiert [Beck et al., 2000]. Neue Studien zeigen, dass das entstandene  $P_i$  die Entfernung des Cbfa1 aus dem Zellkern unterstützt [Fujita et al., 2000a]. Tage später folgt die Mineralisierung der Matrix als verzögerte Antwort auf die nukleare Abwesenheit des Cbfa1. Die durch Phosphat induzierte Abwesenheit des Cbfa1 führt andererseits zu einer Reduktion der Osteocalcinexpression, da die nukleare Anwesenheit des Cbfa1 für die Expression des spezifischen Satzes aus knochenspezifischen Genen wie Bone Sialoprotein, Osteocalcin und ALP erforderlich ist [Fujita et al., 2000a; Fujita et al., 2000b]. Das Phosphatsignal löst offenbar verschiedene scheinbar konträre Antworten aus, deren Kompatibilität in weiteren Studien gezeigt werden muß.

Das dem Medium zugesetzte kalziotrope Hormon Vitamin  $D_3$  kann *in vivo* die Konzentration an freiem Kalzium im Serum erhöhen und die Mineralisierung steigern, die Deposition der Matrix dagegen wird herabgesetzt [Marie et al., 1985]. *In vitro* bedingt Vitamin  $D_3$  eine Zunahme des zytosolischen freien Kalziumgehalts in murinen Osteoblasten und MC3T3-E1 osteoblastischen Zellen und steigert so ihre Mineralisierung [Lieberherr, 1987; Oshima et al., 1987; Matsumoto et al., 1991].

Ebenso wie Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerophosphat induziert  $VD_3$  die alkalische Phosphatase Aktivität in murinen osteoblastischen Zellen, in murinen MC3T3-E1 Zellen und in humanen Osteoblasten [Haneji et al., 1983; Matsumoto et al., 1991; Koshihara et al., 1991]. In einigen anderen *in vitro* Systemen sind dagegen die ALP Spiegel unter  $VD_3$  Einfluss während dem Beginn der Matrixdeposition erhöht, doch dann folgt der eigentlichen Mineralisierung eine Erniedrigung der ALP Expression [Gerstenfeld et al., 1987; Chentoufi et al., 1993]. In den hier beschriebenen ES Zellen, die induziert wurden, der Osteoblastenlinie zu folgen, wurden die ALP Spiegel nach  $VD_3$  Supplementation hochreguliert, sowohl auf Enzym- wie auch RNA-Ebene. Der ALP Spiegel fiel zum Ende der Kulturzeit etwa an Tag 33 auf einen Basiswert zurück, ein Zeitpunkt an dem die Osteoblasten komplett mineralisiert waren, wie über histochemische Färbungen gezeigt wurde (4.4.1.1.).

Die Expression distinkter Gene wird *in vivo* und auch *in vitro* durch 1,25-OH Vitamin  $D_3$  reguliert. Beim Menschen und bei der Ratte werden die Kollagen Typ I Gene [Lichtler et al., 1989] und das Bone Sialoprotein Gen *in vivo* herunterreguliert [Oldberg et al., 1989]. Osteopontin [Owen et al., 1991] und Osteocalcin dagegen werden hochreguliert [Price und Baukol, 1980; Lian et al., 1989; Koshihara et al., 1996].

Die mRNA Synthese des Osteopontin und der natriuretischen Peptide (NP) steigt in MOB Zellen (murinen Osteoblasten) *in vitro* durch  $VD_3$ . NPs ihrerseits unterdrücken die Zellproliferation und

erhöhen das intrazelluläre cGMP, was wiederum die Expression der alkalischen Phosphatase und des Osteocalcins wie auch die Mineralisierung der Zellen induziert [Hagiwara et al., 1996].

Bei Mäusen scheint das Osteocalcingen sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* unter Einfluss von  $VD_3$  differentiell reguliert zu werden [Zhang et al., 1997]. Im allgemeinen sinkt die Osteocalcinexpression unter  $VD_3$  Gabe, in drei osteoblastenähnlichen murinen Osteosarkoma Zelllinien jedoch blieb die Expression des Osteocalcings nach  $VD_3$  Behandlung unverändert, primäre Maus Kalvarienzellen antworteten sogar mit einer schwachen positiven Reaktion [Celeste et al., 1986]. MOB Zellen in Kultur dagegen haben die Kapazität in Antwort auf  $VD_3$  vermehrt Osteocalcin zu exprimieren und zu kalzifizieren [Chen und Fry, 1999].

Für die differentielle Regulation des Osteocalcings scheinen drei Parametern seiner nuklearen Struktur verantwortlich zu sein, die auch für seine Transkription während der progressiven Expression des osteoblastenspezifischen Phänotyps sorgen. Diese sind Modifikationen der Chromatinstruktur, die Organisation der Nucleosomen und die Organisation der nuklearen Matrix in Antwort auf Wachstumsfaktoren und Steroidhormone [Stein et al., 1997].

Neben der Regulation auf molekularer Ebene scheint die differentielle Regulation des Osteocalcings an der unterschiedlichen Antwort auf akute oder chronische Behandlung mit  $VD_3$  zu liegen [Zhang et al., 1997; Lian et al., 1997; Sims et al., 1997]. Weiterhin scheint der von  $VD_3$  vermittelte Effekt mit der Zeit, in der mit der Applikation begonnen wird, zu variieren. Die Stimulation der Osteocalcinproduktion ist wahrscheinlich vom Reifungszustand der osteogenen Zelle abhängig, kein Effekt kann mit Applikation während der frühen proliferativen Phase beobachtet werden [Ishida et al., 1993; Lohmann et al., 2000]. In ES Zellen beginnt der kritische Zeitpunkt zur wirkungsvollen Behandlung auch erst mit Tag 5 der Kultur, wenn die Differenzierungsrichtung der Zellen bereits determiniert ist, denn während der ersten 5 Tage antworten die Zellen nicht auf das extrazelluläre Signal. Studien mit primären Ratten Osteoblasten weisen darauf hin, dass  $VD_3$  seine Effekte in frühen Osteoblasten auf der Transkriptionsebene ausübt, posttranskriptional dagegen in reiferen Osteoblasten [Shalhoub et al., 1998]. Generell zeigen auch verschiedene Mäusestämme eine genetisch determinierte Variabilität in der Antwort auf osteoinduktive Stimuli [Marusic et al., 1999; Thomas et al., 2000].

Die differentielle Regulation als Antwort auf Substanzen ist in murinen Zellen nicht nur auf  $VD_3$  begrenzt. Auch auf andere Substanzen wird die molekulare Antwort differentiell reguliert. Dexamethason, ein Glucocorticoid, das in murinen osteoblastenähnlichen Zellen normalerweise die Zellproliferation inhibiert [Chen et al., 1983], zeigt auf ES Zellen den gegenteiligen Effekt. ES Zellen, die ab Tag 14 mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und Dexamethason behandelt wurden, zeigten eine 7-fache Zunahme der Knochenaggregate [Buttery et al., 2001].

Der Transkriptionsfaktor Cbfa1 wird von  $VD_3$  reguliert. Die Behandlung primärer Osteoblasten mit  $VD_3$  verhindert die Bindung des OSF2 Transkriptionsaktivators (osteoblastenspezifischer Faktor), dem Produkt des Cbfa1 Gens, an ein kritisches osteoblastenspezifisches Cis-Element, das in den murinen Osteocalcingenen vorhanden ist [Ducy et al., 1997; Frendo et al., 1998]. Ebenso greift

1,25-OH Vitamin D<sub>3</sub> schon einen Schritt vorher in die Transkriptionskaskade ein, indem es die *Cbfa1* Expression zu inhibieren scheint [Ducy et al., 1997]. In den von ES Zellen abstammenden Osteoblasten dagegen wird die Osteocalcinexpression von VD<sub>3</sub> gesteigert, ähnlich wie auch die Osteopontin Expression unter Einfluss von VD<sub>3</sub> hochreguliert wird [Zhang et al., 1997]. Die gesteigerte Transkription des *Cbfa1* Gens während der induzierten EB Differenzierung könnte von der dem Medium zugesetzten Ascorbinsäure ausgelöst worden sein, denn Ascorbinsäure stabilisiert die Bindung von OSF2, dem Produkt des *Cbfa1* Gens, an das regulatorische *Cis*-Element im Osteocalcingen und könnte so zu einer gesteigerten Transkriptionssynthese des Osteocalcingens geführt haben [Xiao et al., 1997].

Die Tatsache, dass  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und VD<sub>3</sub> undifferenzierte ES Zellen in die Differenzierungslinie zu Osteoblasten lenkt, die alle Hauptmarker der Mineralisierungsprozesse exprimieren, favorisiert ES Zellen als neues Modellsystem zum Studium der Osteogenese *in vitro*.

### 5.3.1.3 Die sequentielle Regulation knochenspezifischer Gene während der Osteogenese

Die von den ES Zellen abstammenden Osteoblasten produzieren einige knochenspezifische Transkripte, darunter Osteopontin, Osteonectin, Bone Sialoprotein und Osteocalcin, denen verschiedene Aufgaben während der Knochenbildung zukommen. Sie werden mit Knochenbildung und -umbau in Zusammenhang gebracht, scheinen jedoch nicht direkt die Fähigkeit der Osteoblasten zu beeinflussen, eine mineralisierte Knochenmatrix zu bilden [Denhardt und Guo, 1993; Termine und Robey, 1996; Ducy et al., 1996a; Rittling et al., 1998; Delany et al., 2000].

Während der drei Hauptphasen der Osteogenese (a) Proliferation von Osteovorläuferzellen, (b) Deposition einer kollagenen Matrix und Expression alkalischer Phosphatase und (c) Mineralisierung ist das Expressionsmuster typischer Marker zeitlich und sequentiell organisiert [Lou et al., 1999; Riew et al., 1998, Lou et al., 2000; Beck et al., 2000]. In vorangegangenen Studien sind diese Aspekte nur teilweise durchleuchtet worden, in der vorliegenden Arbeit wurde die zeitliche Abfolge aller knochenspezifischen Marker herausgearbeitet.

Dem Mineralisierungssprozess vorangehend sekretieren die Osteoblasten und die Osteovorläuferzellen eine kollagene Matrix. *In vivo* erscheint Kollagen Typ I in 15 Tage alten Ratten-Mandibeln vor der Kalzifizierung und verschwindet gleich nach der Kalzifizierung wieder [Aubin et al., 1995].

Sobald die Kollagen Typ I Matrix sich gebildet hat, wird die progressive Mineralisierung von temporalen Änderungen der Genexpression begleitet, denn bei Erscheinen des mit den Kollagenfibrillen assoziierten kristallinen Hydroxyapatits, ausgelöst von  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure, sinkt gleichzeitig die Transkriptionsrate des Kollagens [Beck et al., 2000].

Die Mineralisierung der Matrix wird durch die Expression des membrangebundenen Glycoproteins alkalische Phosphatase initiiert, das mit der Zellmembran über eine Phosphatidyl-Inositol-Glycan Struktur verbunden ist [McComb et al., 1979; Low, 1987]. Alkalische Phosphatase wird in großen Mengen von Osteoblasten *in vivo* exprimiert und wurde ebenfalls in Differenzierungsstudien mit osteoblastenähnlichen Zellen *in vitro* gefunden [Zernik et al., 1990; Gerstenfeld et al., 1987]. Schon in Abwesenheit von Induktoren zeigten auch die Embryoid Bodies eine alkalische Phosphatase Aktivität, die nach Zugabe der Supplemente erhöht wurde (4.4.1.3.2.).

Beide Gene, sowohl Kollagen Typ I wie auch ALP werden demnach während der initialen Phase der Osteoblastendifferenzierung vor dem Erscheinen der mineralisierten Matrix exprimiert [Stein et al., 1990; Malaval et al., 1994; Yao et al., 1994; Plant und Tobias, 2001], wobei die Stimulation der Prokollagen mRNA früher erfolgt und von einem progressiven Anstieg der ALP Expression gefolgt wird [Franceschi et al., 1992]. Die beschriebene zeitliche Abfolge der Transkription des Kollagen Typ I Gens und des ALP Gens konnte auch in den supplementierten EB Kulturen beobachtet werden.

Die initiale Kollagen Expression wird *in vitro* von der Expression des Osteopontin Gens gefolgt [Sodek et al., 1991]. Die Ergebnisse von Thomas et al. [2000] bestätigend, konnte Osteopontin mRNA in den induzierten ES Kulturen in geringen Mengen schon vor der Mineralisierung nachgewiesen werden und erhöhte sich graduell mit voranschreitender Mineralisierung.

*In vivo* erschien Osteopontin fast simultan mit Osteonectin an Tag 16 der Embryonalentwicklung zum Zeitpunkt der Kalzifizierung [Sasano et al., 2000]. Auch in den von ES Zellen abstammenden Osteoblasten erhöht sich die Osteopontin Expression gleichzeitig mit Osteonectin im Zuge der Mineralisierung. Zu dieser Zeit ist der Osteocalcinspiegel noch niedrig, aber nachweisbar [Aubin et al., 1995].

Erst nachdem die Mineralisierung bereits fortgeschritten ist, wird auch der erste der osteoblastenspezifischen Marker, das Bone Sialoprotein, exprimiert [Stein et al., 1989, 1990; Owen et al., 1990; Strauss et al., 1990; Kasugai et al., 1991; Yao et al., 1994; Plant und Tobias, 2001]. Bone Sialoprotein ist einer der primären Marker terminal differenzierter Osteoblasten, denn Bone Sialoprotein Expression ist auf jene Zellen begrenzt, die eine Kollagen Typ I Matrix sezerniert haben und deshalb aktiv mineralisieren [Chen et al., 1992]. Nach der Bildung der Matrix wird von den relativ reifen Osteoblasten auch der Spiegel des Osteocalcins, dem spätesten und einzigen echtem osteoblastenspezifischen Gen, merklich erhöht [Franceschi et al., 1992]. Auch die ALP Expression erhöht sich nochmals [Aubin et al., 1995]. Die aus den erwähnten Publikationen bekannte sequentielle Regulation der knochenspezifischen Gene bestätigt sich auch für die induzierte Osteoblastendifferenzierung der ES Zellen. In den ES Zellkulturen stieg die Expression des Bone Sialoprotein und des Osteocalcins an, sobald die Matrix heranreifte und mineralisierte (4.4.1.3.3.).



Die Expression der genannten zeitlich verschalteten knochenspezifischen Gene wird in Osteoblasten von *Cbfa1* Gen reguliert, das für den osteoblastenspezifischen Transkriptionsaktivator kodiert. Zuzüglich seiner kritischen Rolle während der Osteoblastendifferenzierung kontrolliert *Cbfa1* die Knochenbildungsrate der ausdifferenzierten Osteoblasten [Ducy et al., 1999]. Es reguliert nicht nur die Expression des Osteocalcingens, denn *Cbfa1* Bindungsstellen existieren ebenso in den regulatorischen Sequenzen der meisten für die Entwicklung der Knochenmatrix verantwortlichen Gene [Ducy et al., 1997]. *Cbfa1* defiziente Mäuse entwickeln ein normal strukturiertes Skelett, es besteht jedoch nur aus Knorpel [Komori et al., 1997; Otto et al., 1997]. Obendrein fehlen ihnen die Osteoklasten, weil die Osteoklastendifferenzierung Faktoren osteoblastischer Abstammung benötigt. Die Chondrogenese dagegen verläuft normal auch in Abwesenheit von *Cbfa1*. Diese Tatsache stimmt mit der nicht vorhandenen *Cbfa1* Expression in reifen Kollagen Typ II exprimierenden Chondrozyten überein [Kim et al., 1999].

Die Regulation der *Cbfa1* Expression selbst ist bis heute nicht geklärt. Der *Cbfa1* Promotor enthält funktionelle *Cbfa1* Bindungsstellen, was auf eine Autoregulation dieses Gens schließen lässt [Ducy et al., 1999]. Dieser Mechanismus könnte auch die plötzliche Expression des *Cbfa1* Gens während der *in vivo* Entwicklung erklären, denn nur 12 Stunden trennen das erste Erscheinen und die Hauptexpressionszeit. Wenn das Gen einmal aktiviert ist, autoaktiviert es sich in einer exponentiellen Weise. Dies scheint auch die an Tag 30 sprunghaft ansteigende *Cbfa1* Expression in den mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$  behandelten ES Kulturen zu bestätigen.

Die Prozesse, die zur ersten Aktivierung des *Cbfa1* Gens führen, können mannigfaltig sein. Die *Cbfa1* Expression scheint von verschiedenen Faktoren reguliert zu werden, abhängig vom Typ des skelettalen Elements und seiner Lokalisierung. Eine Reduktion der *Cbfa1* Expression wurde in *Msx2*- und *Bapx1*-defizienten Mäusen beobachtet. Beide Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren. Die Mäuse mit dem Defekt im *Msx2* Gen zeigten eine verspätete Osteoblastendifferenzierung und Ossifikation in den Schädelknochen, der Defekt bei den *Bapx1* Mäusen war dagegen in dem axialen Skelett lokalisiert [Tribiolo und Lufkin, 1999; Satokata et al., 2000]. Humane Knochenzellen zeigten eine erhöhte *Msx2* Expression nach Stimulation mit  $VD_3$  [Hodgkinson et al., 1993]. *Hoxa-2* dagegen inhibiert die Knochenbildung, indem es die *Cbfa1* Expression verhindert [Kanzler et al., 1998].

Zwischen der *Cbfa1* Aktivierung durch oben genannte Faktoren und der eigentlichen Expression der terminalen Knochenmarker wie etwa Osteocalcin, scheinen jedoch noch ungeklärte Zwischenschritte zu liegen. Die *Cbfa1* Expression beginnt während der Embryogenese bereits an Tag 10,5 p.c., die ersten Osteoblasten erscheinen aber erst vier Tage später [Ducy et al., 2000a]. Auch in den embryonalen Stammzellkulturen liegen zwischen der vermehrten *Cbfa1* Expression

und dem ersten Anstieg der Osteocalcinexpression drei Tage. Zwei weitere Transkriptionsfaktoren, die der Ets Transkriptionsfaktorfamilie angehören und die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten kontrollieren, wurden erst kürzlich identifiziert [Vary et al., 2000]. Ets1 und Ets2 werden in signifikanten Mengen im osteogenen System exprimiert. Ets1 wird in proliferierenden präosteoblastischen Zellen exprimiert, Ets2 dagegen wird während dieser Phase nicht transkribiert, wird dann allerdings verstärkt von differenzierenden reifen Osteoblasten exprimiert. Die Ets2 Expression im besonderen geht der Osteopontin Expression voraus und läuft später mit ihr parallel. Als transkriptionelles Zielgen des Ets2 kommt auch Osteopontin in Frage, denn der Osteopontin Promotor besitzt mehrere Ets Bindungsstellen [Vary et al., 2000]. Ets2 könnte deshalb einer der Faktoren zu sein, der die zeitliche Lücke zwischen der Expression des *Cbfa1* und des Osteocalcins schließt. Raouf und Seth [2000] wiesen nach, dass Ets1 mit *Cbfa1* interagieren kann. Des weiteren entwickelten Ets2-transgene Mäuse eine Reihe von skelettalen Anomalien ähnlich denen der Trisomie 16 in Mäusen und dem Down-Syndrom beim Menschen.

Zusammenfassend scheinen die Faktoren, die an der *Cbfa1* Regulation beteiligt sind, eher stadien- und ortsabhängig als zellspezifisch zu sein. Überexpression des *Cbfa1* Gens resultierte in der Erhöhung der Zahl neonataler Osteoblasten, ihre Funktion in Matrixproduktion und Mineralisierung war jedoch gestört [Liu et al., 2001]. Die Anzahl weniger reifer Osteoblasten, die Osteopontin exprimieren, stieg gegenüber der Anzahl terminaler Osteoblasten, die Osteocalcin exprimieren. Dies demonstriert, dass *Cbfa1* die Osteoblastendifferenzierung zu einem späten Zeitpunkt hemmt, obwohl es sie positiv zu früheren Zeitpunkten reguliert. Die transkriptionelle Regulation der Knochenmatrixgene durch *Cbfa1* scheint deshalb auch vom Reifungszustand der Osteoblasten abhängig zu sein. Die Überexpression des *Cbfa1* Gens führte auch nicht, wie zu erwarten wäre, zu einer vermehrten Osteocalcinexpression. Dies zeigt wiederum, dass noch andere Faktoren an der Regulation des Osteocalcingens beteiligt sein müssen, die zu späten Zeitpunkten der Differenzierung induziert werden, oder dass andere Faktoren in frühen Stadien die Osteocalcinexpression unterdrücken.

Die von den ES Zellen abstammenden osteoblastenähnlichen Zellen exprimieren nicht nur knochenspezifische Gene, sondern auch ihre sequentielle Regulation ähnelt den *in vivo* Prozessen, weshalb ähnlich der Kardio- und Neurogenese auch gezeigt wäre, dass die Osteogenese in den Embryoid Bodies in Anlehnung an die *in vivo* Entwicklung verläuft. Die Sequenz von Induktion bis zur Mineralisierung schreitet in einer eng regulierten Abfolge über eine Zeitspanne von drei bis vier Wochen voran, zeigt also eine eher langsame Kinetik als *in vivo*.

#### 5.3.1.4 Veränderung der Osteogenese durch BMP-2

Wie in den bisher beschriebenen Experimenten gezeigt, war die Anwesenheit der mineralisierenden Faktoren  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $\text{VD}_3$  unbedingt notwendig, um die Expression verschiedener osteoblastenspezifischer Marker zu erreichen. Diese Faktoren schienen aber nur die Differenzierung von Osteovorläuferzellen in fertige Osteoblasten zu beeinflussen und für die Mineralisierung dieser Zellen zu sorgen, nicht aber die Prädetermination von mesenchymalen Zellen zu Osteovorläuferzellen, einem Prozess der *in vivo* während der frühen Embryonalentwicklung vonstatten geht. Spezifizierung mesodermaler Zellen zu Vorläuferzellen der verschiedenen Linien geschieht während der EB Differenzierung wahrscheinlich während der Suspensionskultur, einer relativ frühen Phase der Kultur [Kramer et al., 2000]. Das Schicksal der Zellen wird dort festgelegt, jedoch scheinbar unbeeinflusst von den Additiven, die zu diesem Zeitpunkt keine Induktion der knochenspezifischen Marker hervorriefen. Unter dem Aspekt, dass einige Mitglieder der TGF Wachstumsfaktorfamilie mit der Kontrolle der Osteoblastendifferenzierung während der Embryonalentwicklung in Zusammenhang gebracht werden, wurde der Einfluss des BMP-2, in der Suspensionskultur zwischen Tag 3 und Tag 5, auf seine Fähigkeit hin untersucht, auf mesenchymale Zellen induzierend zu wirken und so die Osteogenese zu unterstützen.

Studien mit murinen mesenchymalen Vorläuferzelllinien C3H10T1/2 zeigten ansteigende Expressionen einiger Knorpelmarker unter Einfluss von BMP-2, jedoch einen Abfall der Kollagen Typ I Expression und eine verspätete Induktion der Osteocalcinexpression [Zehentner et al., 1999]. Einige Bone Morphogenic Proteine können die Cbfa1 Expression *in vitro* induzieren [Ducy et al., 1997]. In Anlehnung an die Literatur exprimierten die mit BMP-2 induzierten Osteoblasten im EB zwar vermehrt die Knochenmarkergene Osteopontin, ALP und Cbfa1, die Kollagen Typ I Expression dagegen änderte sich nicht. Die Osteocalcinexpression war zwar gegenüber der Kontrolle gesteigert, kam aber bei weitem nicht an die von  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $\text{VD}_3$  vermittelten Werte heran. Auch in den EB Kulturen könnte die Expression des Osteocalcins wie für C3H10T1/2 Zellen beschrieben verspätet sein, so dass sie erst zu einem späteren hier nicht untersuchten Zeitpunkt gesteigert wird.

Die zusätzliche Gabe von  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $\text{VD}_3$  in Kombination mit BMP-2 steigerte zwar die von BMP-2 allein induzierte Genexpression, aber die von  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $\text{VD}_3$  allein erzielten Werte wurden nach Kombinationsapplikation erniedrigt. Möglicherweise besitzt BMP-2 gegenüber  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $\text{VD}_3$  andere Aktivierungswege, die sich unter bestimmten Bedingungen konträr zueinander verhalten können. BMP-2 Antworten werden generell über spezifische BMP Rezeptoren transduziert. Einige BMP Rezeptoren wurden kloniert und charakterisiert, darunter BMPR-IA, BMPR-IB und BMPR-II [Chen D et al., 1998]. BMP-2 bindet nur schwach an Typ IA oder IB, aber die Koexpression von Typ II mit

Typ IA oder IB erhöht die Bindungsaffinität und die biologische Aktivität [Massague, 1996]. BMP Rezeptoren Typ IA und IB vermitteln verschiedene Signale verantwortlich für alternative Differenzierungswege [Chen D et al., 1998]. Das zeitliche Expressionsmuster dieser selektiven Rezeptoren in unspezifizierten Vorläuferzellen scheint ein Schlüsselschritt in der Bestimmung und Spezifikation von Osteoblasten und Chondrozyten während der Differenzierung zu sein. Für die Osteogenese spielt die Expression von BMPR-IB eine große Rolle. Die Expression von BMPR-IA in mesenchymalen Vorläuferzellen dagegen ist in die Differenzierung von Adipozyten involviert, die von den gleichen Vorläuferzellen abstammen wie Osteoblasten. Andererseits werden  $VD_3$  Antworten über spezifische  $VD_3$  Rezeptoren vermittelt. Es ist denkbar, dass das Expressionsmuster der  $VD_3$  Rezeptoren unter Einfluss von BMP-2 so verändert wird, dass  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$  nur einen minimalen zusätzlichen stimulierenden Einfluss auf die Osteogenese zeigen können.

### **5.3.2 Die Chondrogenese in Embryoid Bodies**

#### **5.3.2.1 Identifizierung von Markergenen für Chondrozyten**

Die Bestimmung der Markergene zur eindeutigen Charakterisierung der Chondrozyten erfolgte ebenso wie für die anderen untersuchten Organe mittels RT-PCR. Wiederum wurden Oligonukleotidsequenzen für die entsprechenden aus der Literatur bekannten im Knorpelgewebe exprimierten Gene generiert und ihr spezifisches Transkript in verschiedenen Organen nachgewiesen.

Die Expression des Aggrecan ist in neugeborenen Mäusen strikt auf Knorpelgewebe begrenzt [Glumoff et al., 1994]. Über RT-PCR waren Aggrecantranskripte nur im Knorpelgewebe zu entdecken. Im adulten Knorpel ist der Typ IIB des Kollagen Gens die dominante Form [Ryan und Sandell, 1990]; wird jedoch nur von differenzierten Chondrozyten exprimiert, nicht aber von hypertrophen [Cheah et al., 1991]. Der Typ IIA dagegen wird während der Entwicklung etwa auch im Herzen, der Epidermis, dem Innenohr oder dem Gehirn exprimiert [Cheah et al., 1991]. Deshalb ist zu erwarten, dass der Typ IIA auch während der Differenzierung der ES Zellen exprimiert wird. Die Nutzung des Kollagen Typ II Gens als Markergen müsste sich demnach auf die Spleißvariante B beschränken.

Auch das Link Protein ist in Funktion eines Markergens in seiner Expression auf Knorpelmaterial limitiert.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Biglycan auch in Muskel und Niere exprimiert wird, was den Nachweis der entsprechenden Signale über RT-PCR unterstreicht [Bianco et al., 1990; Wilda et al., 2000].

Im Einklang mit seiner Funktion, der Assoziation der Kollagenfibrillen, ließen sich Decorin Transkripte sowohl im Knochen wie auch im Knorpel nachweisen. Im Knochen ist Decorin in der Kalzifizierungszone lokalisiert, in der mineralisierten Matrix befindet sich weniger Decorin [Zhang et al., 1995]. Ähnlich wie hier über RT-PCR konnten Decorin Transkripte in adulten Mäusen über Northern Analyse auch im Herzen nachgewiesen werden [Danielson et al., 1997].

Scleraxis Transkripte werden während der Embryogenese schon an Tag 10,5 p.c. exprimiert, bevor die eigentliche Chondrogenese an den Tagen 12,5 bis 14 einsetzt [Rugh, 1990]. In Knochenprimordien ist die Scleraxis Expression auf das Perichondrium begrenzt, der Quelle an Stammzellen, aus denen sich neues Knorpel- und Knochengewebe entwickelt. In Schädelknochen oder seinen Vorläuferzellen konnte Scleraxis nicht nachgewiesen werden. Diese Knochen entwickeln sich ohne ein knorpeliges Intermediat. Somit ist Scleraxis nur in die Chondro- nicht aber die Osteogenese involviert. Übereinstimmend mit Literaturdaten wird Scleraxis in sehr niedrigen Spiegeln auch von nicht chondrogenen Zelltypen exprimiert [Cserjesi et al., 1995], deshalb ist es als Markergen nicht geeignet.

Die Sox9 Expression startet während der *in vivo* Chondrogenese in den mesenchymalen Chondrovorläuferzellen und erreicht einen sehr hohen Spiegel in differenzierten Chondrozyten während der Deposition der extrazellulären Matrix. In hypertrophen Chondrozyten dagegen wird die Sox9 Expression komplett herunterreguliert. Außerdem wird Sox9 in diskreten Zonen anderer Gewebe wie etwa dem Urogenitaltrakt, dem Gehirn oder dem Herzen [Zhao et al., 1997; Wright et al., 1995] exprimiert.

Als knorpelspezifische Markergene wurden demnach Aggrecan, Kollagen Typ IIB und Link Protein identifiziert, die im erweiterten EST Anwendung finden könnten.

### **5.3.2.2 Wachstumsfaktoren der TGF $\beta$ Superfamilie modulieren die Chondrogenese in Embryoid Bodies**

Die vorliegende Arbeit belegt, dass ES Zellen in der Lage sind, über EBs in chondrogene Zellen zu differenzieren. Im Gegensatz zur serumfreien Linienselektion für neuronale Zellen enthielt das Medium für die Differenzierung der skelettalen Elemente fötales Kälberserum (FCS), denn die Zugabe hoher Konzentrationen an FCS (ca. 10 %) zum Kulturmedium ist zur Induktion von Chondrozyten weit verbreitet. FCS selbst wirkt als starkes Mitogen und induziert die gesamte Kaskade der terminalen Differenzierung [Bruckner et al., 1989]. Chondrozytenaggregate waren über Alcian Blau nachweisbar, welches spezifisch die Proteoglycane färbt, die in Knorpelgewebe exprimiert werden [Steedman, 1950]. Kollagen Typ II und adulte Proteoglycanproteine wurden über Markierung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Obendrein wurde die Expression der mit Knorpelgewebe assoziierten Gene Scleraxis, Sox9, Aggrecan, Kollagen Typ II, Link Protein sowie Decorin und Biglycan in den mit BMP-2, TGF $\beta_1$ , Insulin und Ascorbinsäure induzierten EBs untersucht.

#### 5.3.2.2.1 Einfluss von BMP-2

Als Mitglied der TGF $\beta$  Superfamilie ist BMP-2 verantwortlich für die Initialisierung der Chondro- und Osteogenese [Wozney, 1992; Duprez et al., 1996]. *In vivo* induziert BMP-2 die Bildung von neuem Knorpelgewebe nach subkutaner Applikation und ebenso *in vitro* die Differenzierung muriner mesenchymaler Vorläuferzellen zu Chondrozyten [Reddi und Cunningham, 1993; Reddi, 1994; Ahrens et al., 1993]. Auch die mesenchymale Zelllinie C3H10T1/2 differenziert in Gegenwart von BMP-2 zu Chondrozyten [Haas und Tuan, 1999].

Aus Studien mit embryonalen Stammzellen ist bekannt, dass BMP-2 die Chondrogenese unterstützt, wenn es an den Kulturtagen 2-5 gegeben wird [Kramer et al, 2000]. Dieses Zeitfenster zwischen Tag 3 und 5, ist charakterisiert durch die Expression der Gene *Brachyury* und *BMP-4*, beide kennzeichnend für eine frühe mesodermale Entwicklung [Yamada et al., 1994; Johansson und Wiles, 1995]. Diese mesodermalen Zellen sind die Zielzellen des BMP-2, denn aus ihnen entwickeln sich die Chondrozyten. Kramer et al. [2000] benutzten rekombinantes humanes BMP-2 in einer Konzentration von 2 ng/ml. In der vorliegenden Arbeit wurde vergleichend der Einfluss einer BMP Konzentration von 10 ng/ml untersucht (4.4.2.3.1.).

Es konnte gezeigt werden, dass die niedrigere BMP-2 Konzentration die Expression der knorpelspezifischen Gene erhöhte, die Gabe von 10 ng/ml BMP-2 induzierte sie noch weiter. Im Gegensatz zu den Kontrollen, die ohne Supplemente kultiviert worden waren, waren die Gene Aggrecan, Kollagen Typ II und Link Protein bei Applikation von 10 ng/ml BMP-2 signifikant induziert. Die vermehrte Synthese von Aggrecan und Link Protein steht im Einklang mit der Bildung einer extrazellulären Matrix unter BMP-2, denn die Proteoglycanaggregate entstehen in der extrazellulären Matrix durch Bindung von Aggrecan und Link Protein an die Hyaluronsäure. Es ist bekannt, dass BMP-2 die Aggrecantranskription stärker als die Transkription des Biglycan und des Decorin reguliert [van Beuningen et al., 1998]. Die verstärkte Induktion des Kollagen Typ II Gens ist überdies damit zu erklären, dass BMP-2 direkt den in die Chondrogenese involvierten Transkriptionsfaktor Sox9 induziert [Healy et al., 1999; Zehentner et al., 1999], dieser dann an eine Erkennungssequenz im ersten Intron des *Col2A1* Gens bindet und dort die Verstärkeraktivität hochreguliert [Lefebvre et al., 1997]. Die transkriptionale Aktivität des Aggrecangens wird ebenfalls von Sox9 *in vitro* und *in vivo* gesteigert [Sekiya et al., 2000; Bi et al., 1999]. Dennoch ist an Tag 32, dem Zeitpunkt der Expressionsanalyse, die Sox9 Expression selbst unter von BMP-2 Einfluss verglichen mit der unbehandelten Kontrolle nicht verändert. Es erscheint deshalb wahrscheinlich, dass Sox9 zu einem früheren Stadium an der Regulation der Chondrogenese beteiligt ist [Healy et al., 1999].

BMP-2 induziert neben seinem Effekt auf molekularer Ebene auch direkt die Chondrogenese, indem es das Ausbleiben der Kondensationsphase einleitet [Shukunami et al., 1998]. BMP

Liganden werden von der Familie der BMP Rezeptoren (BMPR) gebunden und transduzieren deren Signale. Speziell der BMP Rezeptor IB wird für die initialen Schritte der Chondrogenese benötigt. BMPR-IB wird in den frühen Kondensationszonen exprimiert, wo er den programmierten Zelltod (Apoptose) vermittelt, während über BMPR-IA die Rate der chondrogenen Differenzierung reguliert wird [Yamaji et al., 1994; Dewulf et al., 1995; Zou und Niswander, 1995; Zou et al., 1997]. BMPR-IA kommt vermehrt in den schnell wachsenden mesenchymalen Zellen vor, welche die prächondrogene Kondensationszone umgeben, wird aber auch in den prähypertrophen Zonen exprimiert [Yamaji et al., 1994; Dewulf et al., 1995; Zou et al., 1997].

*In vivo* wird in 15 Tage alten Mausembryos zwar BMPR-IB exprimiert, nicht aber BMPR-IA. Erst ab Tag 17 werden beide in Chondrozyten wie auch Osteoblasten koexprimiert. Dieses gewebespezifische räumliche und zeitliche Expressionsmuster der BMP Rezeptoren determiniert anscheinend die spezifische Funktion des BMP-2.

#### 5.3.2.2.2 Synergistische Wirkung von BMP-2, TGF $\beta$ 1, Insulin und Ascorbinsäure

BMP-2 ist auf Grund der gezeigten Daten für die Initialisierung der Chondrogenese in embryonalen Stammzellen verantwortlich (4.4.2.3.1.). Es wirkt in einer sehr frühen Phase der Differenzierung, indem es den Differenzierungsweg von Vorläuferzellen in Richtung der chondrogenen Linie lenkt. Weitere aus der Literatur bekannte die Chondrogenese beeinflussende Faktoren, wie Insulin, Ascorbinsäure und TGF wurden auf ihre Fähigkeit hin, die von BMP-2 induzierte Chondrogenese zusätzlich zu steigern, untersucht. Besonders der Einfluss von TGF $\beta$ 1 auf die ES Zellen wurde untersucht.

TGF $\beta$ 1 übt im allgemeinen wichtige Funktionen während der Säugerentwicklung aus. Eine wichtige Rolle wird ihm in der Produktion extrazellulärer Matrixmoleküle wie Kollagen, sowie auch in der Zellproliferation und der Differenzierung zugeschrieben [Lawrence, 1996]. Drei eng verwandte Isoformen des TGF (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ 3) werden in einem definiertem zeitlichen und räumlichen Muster während der Embryonalentwicklung exprimiert [Roberts und Sporn, 1990]. In mesenchymalen Geweben ist TGF- $\beta$ 1 normalerweise die prädominante Form. So wird es auch im undifferenzierten Mesenchym exprimiert, dass differenzierendes Knorpelgewebe umgibt, aber auch im Perichondrium, dem undifferenzierten Mesenchym der Lunge und im Intestinaltrakt [Lawler et al., 1994]. *In vitro* induziert TGF $\beta$ 1 etwa in der Mauszelllinie C3H10T1/2 die Bildung dreidimensionaler Sphäroide mit knorpelähnlicher Histologie, in denen Kollagen Typ II, Link Protein und Proteoglycane, speziell Decorin, deutlich hochreguliert werden [Denker et al., 1995; Izumi et al., 1992].

Konträr zu diesen Veröffentlichungen fanden Kramer et al. [2000], dass die Applikation von TGF $\beta$ 1 während der EB Differenzierung die Expressionsspiegel knorpelspezifischer Marker reduziert. Die unter 4.4.2.3.2. beschriebenen Daten stehen jedoch im Einklang mit der Literatur. Es konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Behandlung mit TGF in einer minimal gesteigerten oder

unveränderten Chondrogenese in den Embryoid Bodies resultiert. Die Steigerung der Aggrecan, Kollagen Typ II und Link Protein Expression steht der unveränderten Regulation der Decorin und Biglycan Expression gegenüber. Auf Proteinebene war der stimulierende Einfluss des TGF $\beta_1$  über Bestimmung des Proteoglycangehalts der EBs nicht detektierbar.

Eine Behandlung mit BMP-2 und TGF $\beta_1$  resultierte in einer deutlichen synergistischen Stimulation der Chondrogenese [Chen P et al., 1991]. Die Expression der Markergene Aggrecan und Kollagen Typ II wurde im Vergleich zu BMP-2 stimuliert, der Proteoglycangehalt nahm jedoch im Gegensatz zur alleinigen Behandlung mit BMP-2 ab. Die Stimulation der Aggrecanexpression vermittelt von beiden Faktoren scheint sich an Tag 30 noch nicht auf Proteinebene eingestellt zu haben, denn die Bestimmung der mRNA Expressionen erfolgte an Tag 32, der Gehalt an Proteoglycanen wurde jedoch schon an Tag 30 bestimmt.

Im Hinblick auf alle vorliegenden Parameter steigert TGF die von BMP-2 induzierte Chondrogenese der embryonalen Stammzellen im Einklang mit der Literatur: Die TGF $\beta_1$  Gabe zu dem frühen Zeitpunkt der Kultur zwischen Tag 3 und Tag 5 führt zu einer Stimulation der Chondrogenese, denn es ist bekannt, dass TGF $\beta_1$  die frühe Chondrozytendifferenzierung stimuliert, nicht aber die terminale Differenzierung [Denker et al., 1995]. Die Transkription des BMP-2 Gens wird durch TGF $\beta_1$  und BMP-2 selbst regulatorisch erhöht, so dass die exogenen Faktoren auch über die zusätzliche Erhöhung des endogenen BMP-2 Spiegels die Chondrogenese unterstützen [Harris et al., 1994; Feng et al., 1994].

Wie TGF die vielfältigen biologischen Effekte ausübt ist bis heute unklar. Bis zu 8 Rezeptoren mit der Kapazität, mit TGF zu interagieren, sind bisher nachgewiesen worden [Massague, 1992]. Es liegen genetische Beweise dafür vor, dass die TGF Typ I und Typ II Rezeptoren für die meisten der biologischen Aktivitäten des TGF verantwortlich sind [Laiho et al., 1990, 1991; Geiser et al., 1992]. Die generelle Kolo-kalisierung von Rezeptor und Ligand impliziert die auto- oder parakrine Funktion des TGF $\beta$  [Lehnert und Akhurst, 1988; Fitzpatrick et al., 1990; Pelton et al., 1990a, b, 1991]. Die Ausstattung der jeweiligen Zelle mit den verschiedenen Rezeptortypen bestimmt offenbar die Wirksamkeit des TGF, also seine inhärente Fähigkeit, zu bestimmten Zeitpunkten stimulierend oder hemmend zu wirken.

Ascorbinsäure gilt neben seiner osteoinduktiven Funktion auch als Induktor der Chondrogenese. Sie fördert die Biosynthese des Kollagen Typ I, wie unter 5.3.1.2. gezeigt wurde, aber auch die Akkumulation des Kollagen Typ II im besonderen und induziert die Organisation der extrazellulären Matrix [Zweyer et al., 1994; Dozin et al., 1992]. Zugabe von Ascorbinsäure induziert ferner die Synthese von hochmolekularen Proteoglycanen und die Akkumulation des Decorin in die extrazelluläre Matrix [Takeuchi et al., 1993; Bounelis und Daniel, 1983].



Ascorbinsäure erhöht auch in den Embryoid Bodies den von BMP-2 und TGF erzielten Effekt additiv. Unterstützt wird sie dabei von dem zweiten Additiv Insulin, das für die Zelldifferenzierung allgemein unbedingt notwendig ist [Quarto et al., 1992]. Der anabole Effekt des Insulin auf die Hyaluronsäure und Kollagen Typ II Synthese ist schon in den 80er Jahren in Chondrosarcomachondrozyten beobachtet worden [Arville und Mason, 1983; Bembenek et al., 1982]. Insulin unterstützt auch die Deposition von Proteoglycanen und steigert die DNA Synthese [Maor et al., 1993].

Sowohl Ascorbinsäure wie auch Insulin unterstützen die terminale Differenzierung der Chondrozyten wegen ihres anabolen Effekts, sind aber keine Induktionsfaktoren im eigentlichen Sinne, die das Schicksal von Vorläuferzellen beeinflussen, denn sie haben keinen Einfluss auf das einmal abgespielte Chondrozytendifferenzierungsprogramm [Cancedda et al., 1995].

#### 5.3.2.2.3 Die sequentielle Regulation der knorpelspezifischen Gene während der Chondrogenese

Das Ergebnis der Chondrogenese ist letztendlich sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* die terminal differenzierte Chondrozyte mit der sie umgebenden Matrix. Die beiden Hauptbestandteile der Matrix sind Kollagenfibrillen und Aggregate von Proteoglycanen, wie Aggrecan, Decorin und Biglycan. Der Prozess, in dem Aggrecanmoleküle über eine spezifische Bindung zur Hyaluronsäure aggregieren, wird vom Link Protein unterstützt, das sowohl Aggrecan wie auch Hyaluronsäure bindet [Hardingham, 1979]. Die Expression dieser Produkte der fertigen Chondrozyte wurde während der *in vitro* Chondrogenese der ES Zellen untersucht. Auch die Transkriptionsfaktoren Scleraxis und Sox9, die in die frühen Phasen der Chondrogenese involviert sind, wie auch Transkriptionsfaktoren, die in allgemeine Entwicklungsprozesse eingreifen, wie Oct4 und Sox2, wurden untersucht. Sox2 impliziert als Marker für neuronale Differenzierungswege, dass die Differenzierung zu Nervenzellen in den induzierten Kulturen unter BMP-2 und TGF abgeschaltet ist, denn eine erhöhte Sox2 Expression zeigte sich gegenüber den nicht supplementierten Kontrollkulturen nur an Tag 5.

Die Reifung der Chondrozyten im Prozess der endochondralen Ossifikation folgt wie auch die Osteogenese einem zeitlich regulierten Entwicklungsprogramm, in dem sich die aufeinanderfolgenden Zellstadien molekular voneinander abgrenzen lassen. Chondrovorläuferzellen exprimieren Kollagen Typ I, während die Induktion des Kollagen Typ II parallel mit der Reifung der Zellen einhergeht [Kosher et al., 1986]. Die Expression des Typ X Kollagen ist auf hypertrophe Chondrozyten begrenzt und die Induktion der Typ X mRNA wird als Signal im Übergang des zellulären Phänotyps von proliferierenden zu hypertrophen Chondrozyten angesehen [Gerstenfeld und Landis, 1991]. Die hypertrophen Chondrozyten ihrerseits stellen den Übergang zu Knochengewebe dar. Die Differenzierung der Chondrozyten in den EBs hatte

allerdings die Reifung adulter Chondrozyten zum Ziel, weshalb die späteren Prozesse nicht weiter untersucht wurden.

Das Scleraxis Gen wird als erstes hochreguliertes Gen der Chondrogenese *in vivo* während der Embryonalentwicklung der Maus in den Sklerotomen und den mesenchymalen Zellen exprimiert, die dem knorpeligen Skelett vorausgehen [Cserjesi et al., 1995]. Zur Zeit der Gastrulation ist Scleraxis im gesamten Embryo exprimiert, bevor es auf die mesenchymalen Vorläufer der Chondrogenese limitiert ist [Brown et al., 1999]. Später wird es herunterreguliert, in Knorpelgewebe ist seine Synthese jedoch erneut vermehrt [Cserjesi et al., 1995]. Die Prozesse während der ES Zelldifferenzierung laufen nach dem gleichen Muster ab, denn während der frühen EB Differenzierung wurden hohe Spiegel an Scleraxis in Zellen nachgewiesen, die noch kein Kollagen Typ II enthielten, später wurden Scleraxis, Kollagen Typ II und Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) koexprimiert [Kramer et al., 2000]. Auch in den hier beschriebenen Kulturen sinkt die anfänglich gesteigerte Scleraxis Expression ab, und steigt an den Tagen 16-19 der Kultur erneut an.

Der zweite untersuchte Transkriptionsfaktor Sox9 ist ebenfalls zu einem frühen Stadium an der Regulation der Chondrogenese beteiligt [Healy et al., 1999]. *In vivo* steigt die Sox9 Expression während der Differenzierung der Chondrozyten und wird direkt von BMP-2 induziert [Healy et al., 1999; Zehentner et al., 1999]. Auch im Verlauf der Stammzellkultur stieg die Sox9 Expression zu drei Zeitpunkten an.

Der zuerst exprimierte Bestandteil der extrazellulären Knorpelmatrix ist das Decorin. Das Decorin Gen erfährt während der von den ES Zellen abgeleiteten Chondrogenese zwei Expressionsschübe. Es wird vermehrt an den Tagen 5-8 ausgeschüttet, direkt nach der Behandlung der Zellen mit TGF. Die Bindung von Decorin an  $TGF\beta_1$  inhibiert die mitogene Aktivität dieses Wachstumsfaktors, was wiederum die Decorin Synthese reguliert und den Rückgang der Decorin Expression erklärt [Kähäri et al., 1991]. Das Decorin Gen wird ein zweites Mal vor der Reifungsphase parallel zur vermehrten Kollagen Typ II Expression angeschaltet, weshalb es wahrscheinlich die Bildung der Kollagenfibrillen kontrolliert, denn *in vitro* kann die Bindung des Decorins an die Kollagenfibrillenoberfläche eine unkontrollierte übermäßige Fibrillogenese verhindern [Vogel et al., 1984].

Im Gegensatz zum Decorin wird das Biglycan Gen über die gesamte Zeitdauer der Kultur exprimiert, anfangs stärker, später schwächer. Leider ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Rolle das Biglycan in der Chondrogenese übernimmt. Seine Expression geht zumindest der des Kollagen Typ II voraus und es ist ebenfalls in der initialen Phase der Chondrogenese stark exprimiert, so dass es ebenfalls von BMP-2 oder TGF induziert werden könnte.

TGF- $\beta_1$  wird vorzugsweise vom TGF Rezeptor Typ II gebunden, der aber selbst nicht im Knorpel exprimiert wird. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass TGF- $\beta$  Signale über den Typ II Rezeptor eine Rolle in der Physiologie der undifferenzierten Zellen spielen und diese Rolle während der Differenzierung geringer wird, weshalb sich der Einfluss von TGF auf das Decorin Gen vermehrt im früheren Stadium der Kultur widerspiegelt.

Erst im reifen Stadium exprimieren die Chondrozyten Kollagen Typ II und Aggrecan [Takahashi et al., 1998]. Die Expression des Scleraxisgens scheint, wie in der Literatur beschrieben, einen direkten stimulierenden Effekt auf die Aggrecan und Kollagen Typ II Synthese zu haben, denn erst nach vermehrter Expression dieses Gens werden die terminalen Markergene hochreguliert [Liu et al., 1997]. Sox9 reguliert ebenso die Verstärkeraktivität des *Col2A1* Gens hoch, indem es an eine Erkennungssequenz im ersten Intron bindet [Lefebvre et al., 1997]. So ist wahrscheinlich zusätzlich die gesteigerte Kollagen Typ II Expression in der zweiten Kulturwoche zu erklären, der die vermehrte Expression von Sox9 an den Tagen 9-11 vorausgeht. *In vivo* werden Sox9 und Kollagen Typ II während der Chondrogenese koexprimiert [Zhao et al., 1997].

Die transkriptionale Aktivität des Aggrecangens wird ebenfalls von Sox9 *in vitro* und *in vivo* gesteigert [Sekiya et al., 2000; Bi et al., 1999]. Während der induzierten EB Differenzierung steigt die Aggrecanexpression ab der zweiten Kulturwoche an. Am Ende der vierten Kulturwoche steigt die Sox9 Expression erneut und wiederum folgt eine noch deutlichere Steigerung der Kollagen Typ II und Aggrecanexpression in der fünften Kulturwoche. Dies zeigt, dass die Chondrozyten erst in der fünften Kulturwoche vollständig heranreifen. Zu diesem Zeitpunkt sind sowohl die Transkription des Sox9 Gens wie auch die des Scleraxis Gens zum Erliegen gekommen, denn in hypertrophen Chondrozyten ist die Sox9 Synthese komplett abgeschaltet [Zhao et al., 1997].

Die Expression der Aggrecan, Kollagen Typ II und Link Protein Gene sinkt an Tag 35 wieder ab, es werden jedoch nicht die Basiswerte wie zum Beginn der Chondrogenese erreicht. Zur Aufrechterhaltung der chondrogenen Eigenschaften sind offenbar niedrigere Spiegel dieser Gene ausreichend. Primär wird Kollagen Typ II von proliferierenden Chondrozyten synthetisiert, nicht von hypertrophen [Chea et al., 1991]. Unklar ist, ob die Chondrozyten im ES Modell nach Tag 35 in einen hypertrophen Differenzierungszustand übergehen. Beim Übergang zur Hypertrophie wird das Kollagen Typ II vom Kollagen Typ X abgelöst [Tanaka et al., 2000]. Die Kollagen Typ II B Expression sinkt zwar an Tag 34, erreicht aber nicht ihren Basiswert. Noch zu klären wäre, ob zu diesem Zeitpunkt ein Expressionstal erreicht ist, oder das Expressionsmuster der Zellen sich zu Gunsten einer Hypertrophie verschiebt. Korrespondierend mit den vorliegenden Ergebnissen wird die Spleißvariante A des Kollagen Typ II während der Differenzierung der EBs hochreguliert [Kramer et al., 2000]. Sie sinkt jedoch nicht wie die der Spleißvariante B zum Ende der fünften Kulturwoche ab, sondern erreicht ihren Expressionshöhepunkt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass in den behandelten EBs ähnliche molekulare und zelluläre Prozesse ablaufen, wie während der Embryonalentwicklung, wo die initiale Expression des Kollagen Typ II gefolgt wird von dem Auftreten differenzierter Chondrozyten, die von einer Kollagen Typ II positiven Matrix umgeben sind. Diese Fakten erlauben die Nutzung dieses *in vitro* Systems zum Studium der Mechanismen, die in die BMP-2 induzierte Chondrogenese involviert sind.

### **5.3.3 Simultane Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten**

Zur Vereinfachung der Anwendung der erarbeiteten Differenzierungsprotokolle für Osteoblasten und Chondrozyten in einem Testsystem für die Prüfung der teratogenen Wirkung einer Substanz wurde untersucht, ob eine Zusammenfassung beider Endpunkte in einem einzigen Kultursystem möglich wäre.

Wurden die Zellen mit einer Kombination der Supplemente für Knorpel- und Knochenzellinduktion behandelt, war die Expression der osteoblastenverwandten Marker merklich gegenüber der alleinigen Behandlung mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$  reduziert, die der knorpelspezifischen Gene lag deutlich unter den Expressionsspiegeln, die mit BMP, TGF, Insulin und Ascorbinsäure alleine erzielt wurden.

Einzig der stimulierende Einfluss der Ascorbinsäure auf den Aufbau einer extrazellulären Matrix zeigte sich jedoch auch bei additiver Applikation beider Medienzusätze. Sowohl die Kollagen Typ I wie auch die Kollagen Typ II Expression lagen signifikant über der Kontrolle ohne Zusätze. Die Kollagen Typ II Expression war dennoch gegenüber der durch BMP-2 alleine induzierten Antwort vermindert.

Wie schon unter 5.1.3.4. gezeigt, ist BMP-2 im ES Modell im Gegensatz zu anderen *in vitro* Kultursystemen nicht in der Lage, die Anzahl der differenzierenden Osteoblasten zu erhöhen. BMP-2 stimuliert zwar die Differenzierung von Knorpel- und Knochenvorläuferzellen, verändert aber nicht ihr Schicksal im Hinblick auf ihren Differenzierungsweg [Komaki et al., 1996]. Das Potential der embryonalen Stammzellen als Antwort auf BMP-2 in Osteoblasten oder Chondrozyten zu differenzieren, scheint prädestiniert zu sein, ähnlich wie es bei Maus Kalvarienzellen gefunden wurde [Komaki et al., 1996]. Osteoblastenähnliche Zellen, deren Schicksal einmal festgelegt wurde, werden daher nicht mehr von der BMP-2 Behandlung beeinflusst.

Das während der chondrogenen Differenzierung im EB relativ früh exprimierte Decorin könnte bei der Inhibierung der Osteogenese auch eine Rolle spielen, da Decorin als negativer Regulator der Mineralisierung in Rattenembryos gilt [Hoshi et al., 1999].

Sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* kann  $\text{TGF}\beta_1$  die Chondrogenese fördern, aber es ist nicht in der Lage, die Knochenbildung einzuleiten [Denker et al., 1995; Izumi et al., 1992; Joyce et al., 1990; Kulyk et al., 1989; Miura et al., 1993; Wozney et al., 1988]. Die Expression der alkalischen Phosphatase, des Schlüsselenzyms der Mineralisierung, wird durch  $\text{TGF}\beta_1$  sehr stark gehemmt [Noda und Rodan, 1986], so dass es nicht zur korrekten Ausbildung der Knochenmatrix kommen kann.  $\text{TGF}\beta_1$  reduziert ebenfalls die Osteocalcinexpression [Spinella-Jaegle et al., 2001; Alliston et al., 2001; Ducy et al., 2000b].

Während das für die Chondrogenese unerlässliche BMP-2 die osteogenen Marker reduziert, verursacht das für die Osteogenese benötigte 1,25-OH Vitamin  $\text{D}_3$  *in vitro* eine allgemeine Inhibierung der Chondrogenese. In MCC Zellen beispielsweise verursacht es eine Hemmung der Knorpelbildung und vermindert nicht nur die Kollagen Typ II mRNA Expression, sondern auch den Proteoglycangehalt [Kitaoka et al., 2001]. Die unter  $\text{VD}_3$  Einfluss verzeichnete verminderte Aggrecan und Kollagen Typ II Expression wäre demnach dem inhibitorischen Effekt des  $\text{VD}_3$  zuzuschreiben. Obendrein moduliert  $\text{VD}_3$  die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten durch die Retardierung der Chondrozytenreifung [Kato et al., 1990].

Auf Grund des gegenseitigen inhibitorischen Effektes der Medienadditive ist es trotz des vorhandenen Potentials der ES Zellen, in beide Zelltypen zu differenzieren, nicht möglich, Knorpel- und Knochenzellen in derselben Kulturschale zu differenzieren. Auch in embryonalen mesenchymalen Zellen des Huhns waren die Konditionen zur *in vitro* Differenzierung von Osteoblasten unterschiedlich zu denen der Chondrogenese [Caplan, 1991].

#### **5.4 Der erweiterte embryonale Stammzell Test (EST) als Embryotoxizitätsmodell**

Gewebe wachsen durch Zunahme der Zellzahl und der extrazellulären Matrix, während Differenzierung mit dem Erscheinen und Verschwinden neuer Genprodukte einhergeht. Geburtendefekte treten wegen Änderungen dieser Ereignisse während der Entwicklung auf. Somit würde ein Testsystem, das Wachstum und Differenzierung beurteilt, bestens geeignet dafür sein, teratogene Potentiale aufzudecken.

Eine minimale Abweichung oder kurzfristige Unterbrechung der Zellreplikation, Zelldifferenzierung, Zellmigration oder Zellinteraktionen kann irreversible Schäden in nahezu jedem Organ hervorrufen. Deshalb wurden morphologische, physiologische und biochemische Techniken bisher in verschiedenen *in vivo* Studien angewandt, um das embryotoxische Potential von Chemikalien oder Wirkstoffen zu charakterisieren. Dabei machen besonders die hohen Dosen in Hinsicht auf das Befinden des behandelten Tieres Probleme. Außerdem können nicht alle gewebespezifischen Effekte unter einer solchen Behandlung erkannt werden. Die Anwendung von *in vitro* Methoden kann in diesen Fällen Abhilfe schaffen und das Leiden der Tiere verringern. Das am häufigsten

verwendete Säuger-Modell zum Nachweis teratogener Effekte an verschiedenen Organen ist die WEC (whole embryo culture, Steele et al., 1983), bei der ganze Embryonen in Kultur den Testsubstanzen ausgesetzt werden. Die Interpretation dieser Studien ist allerdings oft begrenzt und schwierig und ihre Prädiktivität ist nicht sehr verlässlich (70-80%). Außerdem mussten für dieses *in vitro* Modell und auch für den „Micromass“-Test schwangere Tiere verwendet werden. Der EST dagegen wurde mit zwei permanenten Zelllinien entwickelt, der Maus Stammzelllinie ES-D<sub>3</sub> und 3T3 Fibroblasten [Spielmann et al., 1997]. Im Vergleich zu anderen zellulären *in vitro* Embryotoxizitätstests werden die eingangs erwähnten zwei wichtigen Aspekte pränataler Toxizität berücksichtigt, die Inhibierung der Differenzierung der embryonalen Stammzellen und der Vergleich der Zytotoxizitätsunterschiede (Wachstum) zwischen embryonalen Zellen und „adulten“ Zellen.

Eine Studie zur Validierung des bisher existierenden klassischen ESTs, wurde vor kurzem abgeschlossen [Genschow et al., 2000; Spielmann et al., 2001]. Sie verlief in den drei Phasen Prävalidierung, einleitende Validierung und definitive Validierung. Für die statistische Evaluierung wurde bereits in der Prävalidierungsphase ein Prädiktionsmodell für die Vorhersage des embryotoxischen Potentials gegebener Substanzen entwickelt, das in der vorliegenden Arbeit den Klassifizierungsberechnungen zu Grunde gelegt wurde [Scholz et al., 1999]. Während der Prävalidierungsphase wurden 10 Substanzen auf ihr teratogenes Potential getestet. 100%, 88,9% bzw. 91,7% der Prädiktionen nicht (Klasse I), schwach (Klasse II) oder stark embryotoxisch (Klasse III) korrelierten mit den bekannten *in vivo* Daten [Scholz et al., 1999; Genschow et al., 2000]. Während der einleitenden Validierungsstudie wurden sechs Chemikalien, zwei in jeder Klasse, und in der definitiven Validierungsphase 14 weitere Substanzen, fünf in den ersten beiden Klassen und vier in der dritten Klasse unter Blindbedingungen getestet. Die vorhergesagten Klassifizierungen der einleitenden Prävalidierungsphase stimmten zu 62,5% (Klasse I), 87,5% (Klasse II) und 87,5% (Klasse III) und die vorhergesagten Klassifizierungen der definitiven Phase zu 70% (Klasse I), 82,5% (Klasse II) und 81,25% (Klasse III) mit den entsprechenden *in vivo* Klassen überein [Genschow et al., 2000]. Interessanterweise lag die Vorhersagequote in den Klassen stark und schwach embryotoxisch höher als in der Klasse der nicht-embryotoxischen Substanzen.

Diese Validierungsstudie zeigte, dass der klassische EST ein wertvolles Werkzeug bei der *in vitro* Untersuchung embryotoxischer Potentiale von Substanzen sein kann. Obwohl eine morphogenetische Entwicklung innerhalb der EBs nicht möglich ist, weil räumlich kontrollierte Signale fehlen, wird die zelluläre Differenzierung entwicklungsgerecht und zeitabhängig ausgeführt. Daher scheint das ES Differenzierungsmodell geeignet zu sein, Entwicklungsprozesse auf zellulärer Ebene zu analysieren, was eine Voraussetzung für die Erfassung embryotoxischer und teratogener Faktoren ist.

Um die bisher semiquantitative Auswertung des EST zu verfeinern und zu vereinfachen, wurde der EST auf die objektiv quantifizierbare molekulare Ebene übertragen. Zusätzlich zum Endpunkt der Kardiomyozytendifferenzierung wurde die Differenzierung zu Neuronen, Osteoblasten und Chondrozyten in den EST aufgenommen.

Für die sechs Testsubstanzen Penicillin G, 5-Fluoruracil, Retinolsäure, Diphenylhydantoin, Valproinsäure und Thalidomid, die unter anderem auch in der Validierungsstudie benutzt wurden, wurden die klassischen Endpunkte des EST den neu erarbeiteten Endpunkten auf der Ebene der Expressionsanalyse von Markergenen für die Zielorgane Herz, Nerven, Knochen und Knorpel vergleichend gegenübergestellt.

Als Kontrollsubstanz der *in vivo* Klasse der nicht embryotoxischen Substanzen wurde das Penicillin G eingesetzt. Teratogene Effekte, die auf dieses Antibiotikum zurückzuführen wären, konnten weder bei der Maus noch beim Menschen nachgewiesen werden [Boucher und Delost, 1964; Heinenon et al., 1977]. Mit dem EST war sowohl über die klassischen Endpunkte wie auch über die molekularen Marker kein teratogenes Potential von Penicillin G nachzuweisen. Verglichen mit dem *in vivo* Potential wurde Penicillin G deshalb korrekt klassifiziert.

5-Fluoruracil diente in seiner Eigenschaft als Zytostatikum als Positivkontrolle für Substanzen mit einem bekannten starken *in vivo* teratogenen Potential. Als Thymidin-Analog wird es in den Zellen zu 5-FdUMP umgewandelt. Mit Hilfe der Thymidilatsynthetase wird 5-FdUMP zu Thymidilat methyliert, da es zu diesem Enzym eine vielfach höhere Affinität besitzt als das körpereigene Substrat dUMP. Das Thymidilat wird dann zunächst in die RNA, aber auch in die DNA eingebaut. Die Thymidilatsynthetase selbst wird obendrein von 5-Fluoruracil inhibiert und die Zellen verbleiben in der S-Phase des Proliferationszyklus, so dass besonders schnell proliferierende Gewebe in ihrem Wachstum gehemmt werden [Shuey et al., 1994]. Unzählige Missbildungen wie Gaumenspalten und Deformationen der hinteren Extremitäten sowie reduzierte Ossifikation werden deshalb von 5-Fluoruracil induziert [Shuey et al., 1994].

Die teratogenen Effekte des 5-Fluoruracil sind speziesübergreifend beim Menschen und bei Mäusen zu beobachten [Dagg, 1960; Stephens, 1980]. Auch über den EST konnte für diese Substanz deshalb kein distinktes Zielorgan ermittelt werden. Die Auswertung über die Ursprungsgerade zeigt, dass die starke Embryotoxizität des 5-Fluoruracil auf seiner starken allgemeinen Toxizität beruht, denn die  $IC_{50}$  und  $ID_{50}$  unterscheiden sich kaum (der Abstand zur Ursprungsgeraden ist minimal). 5-Fluoruracil wurde für alle Endpunkte gemäß seinem starken teratogenen Potential richtig eingestuft.

Retinolsäure gehört wie 5-Fluoruracil entsprechend seinem starken *in vivo* teratogenen Potential zu Klasse III, obwohl es als endogener Faktor während der Embryogenese allgemein eine

bedeutende Rolle in der Morphogenese, Zellproliferation, Differenzierung und der Produktion extrazellulärer Matrixmoleküle spielt [Degitz et al., 1998a]. Retinolsäure induziert zeit- und konzentrationsabhängig die Differenzierung ektodermaler, mesodermaler und endodermaler Zelltypen [Wobus et al., 1994, 1997; Dani et al., 1997; Drab et al., 1997].

Verschiedene Zelltypen unterscheiden sich wegen ihrer unterschiedlichen Ausstattung mit Retinolsäurerezeptoren in ihrer Antwort auf Retinolsäure [Rohwedel et al., 1999]. Es ist bekannt, dass Retinolsäure zwei konträre Rollen während der frühen ES Zelldifferenzierung ausübt, es inhibiert die Myo- und Kardiogenese, fördert aber gleichzeitig die Adipogenese und Neurogenese. Die beteiligten Signaltransduktionskaskaden scheinen dabei für jeden Differenzierungsweg verschieden zu sein und über andere Kinasen abzulaufen [Bost et al., 2002]. Retinolsäure kann deshalb multiple Effekte über distinkte molekulare Mechanismen auslösen und ist deshalb in seiner Wirkungsweise sehr komplex.

*In vivo* ist Retinolsäure bei der Maus als starkes Teratogen bekannt [Kochhar 1967, 1973, 1977], seine Teratogenität wurde beim Menschen noch nicht gezeigt [Smith et al., 1983]. Die Defekte reichen von Fehlbildungen des zentralen Nervensystems, Gaumenspalten und Herzdefekten bis zu Missbildungen des Innen- und Außenohres und Deformationen der Gliedmaßen, beruhend auf der abnormalen Entwicklung von Knorpelgewebe und skelettalen Elementen [Benke, 1984; Fernhoff und Lammer, 1984; Lammer et al., 1985; Choo et al., 1998; Watanabe und Pratt, 1991; Morris, 1972; Eichele, 1989].

Mit dem Prädiktionsmodell wird Retinolsäure hinsichtlich seines *in vivo* teratogenen Potentials korrekt in Klasse III eingeordnet. Die Darstellung mit der Ursprungsgeraden zeigt jedoch, dass seine Effekte sich weder im Kontraktionsmodell noch nach Übertragung auf die molekulare Ebene im Endpunkt Herz zeigen. Außerdem wird hier deutlich, dass nicht immer eine Inhibierung der Differenzierungsprozesse die Ursache für teratogene Effekte sein müssen. Vielmehr kann eine allgemeine Störung der Differenzierung über die Induktion von Genen negative Auswirkungen auf die Embryonalentwicklung haben. Retinolsäure induziert sowohl die neuronale Differenzierung, wobei intrazelluläre Rezeptoren aktiviert werden [Barres et al., 1994], wie auch die Bildung skelettaler Zellen. Der Effekt der Retinolsäure auf die neuronale Differenzierung der ES Zellen ist weitreichend bekannt. Eine starke Induktion der neuronalen Differenzierung wurde unter Retinolsäurebehandlung an den Kulturtagen 3-5 beobachtet, der Phase der EB Differenzierung zu der die Gene exprimiert werden, die die Ektodermbildung regulieren (5.2.1.1.).

Störungen der Skelettbildung sind auch für Retinolsäure beschrieben worden. Retinolsäure steigert die Sox9 Expression in murinen TC6 Knorpelzellen [Sekiya et al., 2000]. Eine gesteigerte Sox9 Expression könnte auch in den ES Zellen für die gesteigerte hier beschriebene Aggrecanexpression verantwortlich sein, da Sox9 die transkriptionale Aktivität des Aggrecangens erhöht [Sekiya et al., 2000; Bi et al., 1999].



In MC3T3-E1 und fötalen Ratten Kalvarienzellen steigert Retinolsäure profunde Effekte auf das skelettale Wachstum, seine Entwicklung und die Knochenneubildungsrate, sowie spezifische zelluläre Antworten in Knochenzellen [Raouf und Seth, 2000]. In einigen klonalen osteoblastischen Zelllinien steigert Retinolsäure die ALP Aktivität und erhöht auch die Expression des  $VD_3$  Rezeptors und seine biologische Aktivität in MOB Zellen [Grigoriadis et al., 1986; Ng et al., 1988; Nakayama et al., 1990; Chen TL, 1985]. Retinolsäure kann außerdem die Sekretion von Osteopontin stimulieren [Denhardt und Noda, 1998].

Die Induktion von Nervenzellen, Osteoblasten und Chondrozyten kam während der Testauswertung durch die drastisch über die Ursprungsgerade verschobenen  $ID_{50}$  für die Endpunkte Nerven, Knochen und Knorpel zum Ausdruck.

Die weiteren getesteten Substanzen Diphenylhydantoin, Valproinsäure (VPA) und Thalidomid gehören der Embryotoxizitätsklasse II der schwach teratogenen Substanzen an.

Die Antiepileptika Diphenylhydantoin und VPA induzieren nur schwache teratogene Effekte in Versuchstieren, wie Herzdefekte, skelettale Defekte, Wolfsrachen und reduziertes Körpergewicht [Sullivan und McElhatton, 1977; Finnel, 1981; Lorente et al., 1981; Eluma et al., 1984]. Diese Defekte ähnelten denen, die auch beim Menschen beobachtet werden [Hanson et al., 1975; Nau et al., 1981]. Behandelte Föten zeigten unter anderem eine Retardierung der Ossifikation des Skeletts [Ariyuki et al., 1980].

Diphenylhydantoin wird seit 1938 als Antiepileptikum eingesetzt. Außerdem findet es wegen seiner elektrophysiologischen Eigenschaften therapeutische Anwendung bei Herzrhythmusstörungen. Teratogene Effekte des Diphenylhydantoins sind *in vivo* sowohl beim Menschen wie auch bei der Maus beschrieben worden [Harbison und Becker, 1969; Hanson et al., 1975; Martz et al., 1977]. Diphenylhydantoin ist plazentagängig, wodurch erhöhte Diphenylhydantoin Spiegel vor allem im Gehirn und dem Herzen des Fötus entstehen [Mirkin, 1971]. Zu den von Diphenylhydantoin ausgelösten Defekten zählen unter anderem Anomalien im Schädel- und Gesichtsbereich, mentale und neurale Defekte oder auch Defekte am Herzen [Hanson et al., 1975; Bartoschesky, 1982; Nanda, 1989; Harbison und Becker, 1969; Finnell, 1981; Massey, 1966]. Diphenylhydantoin inhibiert spezielle embryonale  $K^+$ -Ströme, die normalerweise während der Repolarisationsphase des Aktionspotentials des Embryoherzens angeschaltet werden [Yaari et al., 1986]. Dieser direkte Effekt auf das embryonale Herz ist der Hauptfaktor der Teratogenität des Diphenylhydantoins.

Tatsächlich konnte über beide Auswertesysteme des modifizierten EST das schwache *in vivo* embryotoxische Potential des Diphenylhydantoins bestätigt werden. Kongruent zu den beschriebenen *in vivo* Effekten zeigten sich alle getesteten *in vitro* Endpunkte gleich empfindlich für eine Behandlung mit Diphenylhydantoin. Mit den geringsten  $ID_{50}$  Werten schien dennoch die Entwicklung der skelettalen Elemente minimal empfindlicher auf Diphenylhydantoingabe zu reagieren. *In vivo* Daten bestätigen die Inhibierung der Chondrogenese, denn unter

Diphenylhydantoinbehandlung ist die Kollagen- und die Glycosaminoglycansynthese reduziert [Bosi et al., 1998].

Das zweite untersuchte Antiepileptikum Valproinsäure ist bei Mäusen, Ratten und Kaninchen schwach teratogen [Whittle, 1976; Sucheston et al., 1979; Brown et al., 1980]. Während der Embryonalentwicklung des Menschen löst VPA Neuralrohrdefekte aus und erhöht das Risiko für Spina bifida aperta [Lindhout et al., 1992]. Bei Mäusen induziert VPA Exenzephalie [Nau et al., 1981b, Kao et al., 1981; Paulson et al., 1985], ein Defekt der durch das fehlende Schließen des kranialen Neuralrohrs hervorgerufen wird. Auf zellulärer Ebene scheint die Hauptursache dafür in der Änderung der Organisation der Zellform und der Zelladhäsion sowie der Hemmung der Aggregation und Axonformation der neuronalen Zellen zu liegen [Turner et al., 1990; Maar et al., 1997].

VPA stört die Funktion neuronaler Zellen im besonderen über die Modulation der Neurotransmitterkonzentrationen. Die Inhibierung der GABA Aufnahme über den GABA Transporter 1 und auch die Hemmung von GABA Transaminasen führt zur Erhöhung der GABA Konzentration im synaptischen Spalt [Eckstein-Ludwig et al., 1999; Godin et al., 1969; Simler et al., 1973]. Auch die natriumabhängige Cholinaufnahme wird von VPA gehemmt, so dass cholinerge Neurone in ihrer Funktion moduliert werden [Miller und Richter, 1985].

Valproinsäure reguliert außerdem die Aktivität einiger Zellzyklus regulierender Gene, wie *p53* und *bcl-2*, deren vermehrte Transkription beim Embryo zu Fehlbildungen führt [Wlodarczyk et al., 1996].

Dass VPA vorwiegend teratogene Effekte an Nervenzellen auslöst, wird mit dem erweiterten EST ersichtlich. Zwar wird VPA über Diskriminanzanalyse entsprechend seinem *in vivo* teratogenen Potential korrekt klassifiziert, dennoch sind über Darstellung mit der Ursprungsgeraden keine embryotoxischen Störungen des VPA an Herzzellen, sowohl auf Kontraktionsebene wie auch auf molekularer Ebene, sowie an Knochen- und Knorpelgewebe auszumachen. Erst im Endpunkt Nerven wird der teratogene Effekt des VPA nachgewiesen.

Thalidomid war die dritte Substanz der Embryotoxizitätsklasse II, die in der vorliegenden Arbeit mit dem erweiterten EST charakterisiert wurde. Seine therapeutische Nutzung als Sedativum wurde 1961 beendet, als es als sehr starkes Teratogen im Conterganskandal publik geworden ist [McBride, 1961; Lenz, 1966]. Bei der Maus war bisher noch kein teratogenes Potential dieses Stoffes nachweisbar [Scott et al., 1977]. Die interessanteste und bisher noch nicht beantwortete Frage ist, worauf die Speziesdivergenzen in der Reaktion auf das Thalidomid beruhen. Die Unterschiede können nicht auf unterschiedlichen Metabolisierungsraten beruhen, da die Plasmahalbwertszeit bei der Ratte (einer unsensiblen Spezies) und beim Kaninchen (einer sensiblen Spezies) sich kaum unterscheiden. Im übrigen sind die meisten Biotransformationsprozesse des Thalidomid spontane chemische Prozesse und laufen ohne

Beteiligung von Enzymen ab. Dennoch zeigten Parman et al. [1999], dass Thalidomid über die Prostaglandin H Synthase oder Lipoxygenase zu reaktiven Intermediaten biotransformiert werden kann. Das dabei entstehende freie Radikalintermediat führt dann zu Oxidationsprozessen an der DNA. Oxidativer Stress verändert im besonderen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren mit redoxregulierenden Cysteinresten in ihrer DNA Bindestelle. Solche Transkriptionsfaktoren sind unter anderem Aktivatorprotein 1 (AP-1), das Tumorsuppressorprotein p53 und ein spezifischer Faktor, der die Expression des NF- $\kappa$ B Immunglobulins reguliert. Tatsächlich scheint Thalidomid die Produktion des Zytokins TNF- $\alpha$  zu unterdrücken und die Aktivität von Interleukinen zu modulieren [Peuckmann et al., 2000]. TNF- $\alpha$  seinerseits scheint die Fähigkeit der ES Zellen herabzusetzen, in Embryoid Bodies zu differenzieren [Wuu et al., 1998]. Die Expression des Rex-1 Gens, ein Markergen für undifferenzierte Zellen ähnlich wie Oct4, wird in Antwort auf TNF- $\alpha$  heraufgesetzt. Außerdem wurden in TNF- $\alpha$  exponierten murinen ES Zellen mehr DNA Strangbrüche gefunden. Thalidomid scheint daher über TNF- $\alpha$  einen zusätzlichen negativen Effekt auf die Proliferation und Differenzierung der ES Zellen auszuüben. Sauer et al. [2000] haben gezeigt, dass Thalidomid im EB Modell als starkes Teratogen wirkt, indem es die Angiogenese mittels Generierung von Hydroxylradikalen hemmt. Obwohl die exakten Mechanismen, die zur Embryopathie führen, immer noch diskutiert werden, scheint die Bildung von Hydroxylradikalen eine generelle Eigenschaft des Thalidomids zu sein [Stephens, 1988; Neubert et al., 1999; Parman et al., 1999].

Auch im erweiterten EST konnte die teratogene Eigenschaft des Thalidomid im EB Modell gezeigt werden. Während im Kontraktionsmodell Thalidomid oberhalb der Ursprungsgeraden zu finden ist, erscheint es im Endpunkt der herzspezifischen MHC Expression unterhalb der Linie. Im Endpunkt Nerven ist eine eindeutige Klassifizierung nicht gegeben, obwohl die molekulare Ebene generell sensibler ist als die Auswertung über die Kontraktionsbestimmung. Mit den neuen Endpunkten Knochen und Knorpel ist das teratogene Potential des Thalidomid wiederum bestimmbar. Für diese Endpunkte unterscheiden sich der IC<sub>50</sub> Wert der Zytotoxizität und die ID<sub>50</sub> der Differenzierungsinhibierung deutlich voneinander.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, erlaubt die Übertragung des EST auf die molekulare Ebene eine korrekte Klassifizierung aller Testsubstanzen gemäß ihrem teratogenen *in vivo* Potential. Über die Expressionsanalyse im TaqMan wird der Test objektiv quantifizierbar und sensibler. Weiterhin führte die Auswertung auf die molekularer Ebene zu einer Verkürzung der Testdauer für den Endpunkt Herz. Unter Einbeziehung der neuen Endpunkte Nerven, Knochen und Knorpel gelang die Identifizierung spezieller Effekte auf unterschiedliche Organe, wie etwa die starke Hemmung der Neurogenese durch VPA.

Die Zytotoxizität, gemessen über den MTT Assay, bestimmt substanzinduzierte Änderungen der metabolischen Aktivität der Mitochondrien oder der Zellintegrität, die mehr oder weniger assoziiert

sind mit dem Tod der Zelle, wohingegen die Embryotoxizität Aussagen über die toxischen Effekte an embryonalen Zellen oder frühen embryonalen Entwicklungsstadien macht. *In vitro* Screening Systeme sollten beide Aspekte, sowohl die Regeneration wie auch die Differenzierung einer gegebenen Zellpopulation einbeziehen, um embryotoxische und teratogene Effekte abschätzen zu können. Die orientierende Verwendung des auf Diskriminanzanalyse beruhenden Prädiktionsmodells des klassischen EST erlaubt auch für den um die neuen Endpunkte erweiterten EST eine 100%ig korrekte Klassifizierung der Testsubstanzen gemäß ihrem *in vivo* teratogenen Potential, es müsste aber dennoch ein neues Prädiktionsmodell berechnet werden. Das alte Prädiktionsmodell gestattet außerdem nicht die Unterscheidung zwischen zytotoxischen oder embryotoxischen Effekten, zumindest für die sechs untersuchten Testsubstanzen. So wird 5-Fluoruracil als starkes Teratogen eingestuft, seine Effekte basieren aber in Wirklichkeit auf seiner allgemeinen zytotoxischen Eigenschaft (maternale Toxizität). Retinolsäure dagegen zeigt in weitaus niedrigeren Konzentrationen als für die Zytotoxizität schon Störungen der Differenzierung, lässt also einen deutlichen Unterschied zwischen differenzierungsabhängigen und zytotoxischen Effekten erkennen. Die Darstellung über die Ursprungsgerade vergleicht direkt die differenzierungsabhängigen embryotoxischen Effekte mit den zytotoxischen Effekten der zu untersuchenden Substanz, teilt aber die Substanzen nur in die zwei Klassen teratogen oder nicht teratogen ein. Generell gestaltet sich die Definition „schwach teratogen“ als schwierig, so dass die Einteilung in zwei Klassen ohnehin sinnvoller wäre.

Für den neuen erweiterten EST könnte die sequentielle Untersuchung der verschiedenen Endpunkte gewählt werden. Der Endpunkt Herz wäre als erstes Testsystem favorisiert, da die Testdauer mit 8 Tagen am kürzesten ist. Negative Substanzen könnten nachfolgend entsprechend in der Reihenfolge der unterschiedlichen Testdauer in den Modellen Nerven (14 Tage), Knochen (30 Tage) und Knorpel (32 Tage) untersucht werden.

Abschließend sei noch einmal betont, dass der EST als *in vitro* Embryotoxizitätsmodell den großen Vorteil hat, mit permanenten Zellen zu arbeiten. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem stark embryotoxische Substanzen weitgehend korrekt eingestuft werden, so dass diese Substanzen als Entwicklungskandidaten im Screeningverfahren wegfallen. *In vivo* Tests würden mit solchen Substanzen nicht mehr durchgeführt, was auch das Leiden der Versuchstiere verringern würde.

## 6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde basierend auf dem klassischen EST nach Spielmann et al. [1997] ein erweitertes *in vitro* Embryotoxizitätsmodell entwickelt, zu dessen Durchführung keine trächtigen Tiere getötet werden müssen. Die Verwendung molekularer Marker, über die die Störung der Differenzierung embryonaler Stammzellen in Kardiomyozyten, Nervenzellen, Osteoblasten und Chondrozyten erfasst wurde, erlaubte die richtige Einstufung des teratogenen Potentials eines Testsatzes von sechs Substanzen im Vergleich zu ihrer *in vivo* Embryotoxizität.

Die Auswahl der Testsubstanzen ist limitierend und kann nur die Grundlage zur Entwicklung eines neuen Prädiktionsmodells (PM) bilden. Weitere Substanzen mit bekannter *in vivo* Embryotoxizität müssen untersucht werden, um ein aussagekräftiges Modell zu erhalten. Nach erfolgter Entwicklung eines solchen Modells muss es in einer Prävalidierungs- und Validierungsstudie auf seine Anwendbarkeit überprüft werden.

Die molekulare Expressionsanalyse der Markergene für die verschiedenen Endpunkte macht den EST gegenüber dem klassischen Modell sensitiver und objektiv quantifizierbar. Die Betrachtung der neuen Endpunkte (Differenzierung zu Nerven, Knochen und Knorpel) deckt falsch negative Befunde auf und geeignet zur Untersuchung der Mechanismen der Teratogenität und spezifischen Wirkung auf einzelne Endpunkte.

Insbesondere die Identifizierung neuer Differenzierungsprotokolle zur Knochen- und Knorpelinduktion ermöglicht weiterführende Arbeiten. Es konnte gezeigt werden, dass die Osteo- und Chondrogenese in Embryoid Bodies die *in vivo* Prozesse rekapitulieren, denn die Expression der gewebespezifischen Gene ist zeitlich organisiert. Das EB Modell bietet ein geeignetes *in vitro* System, um weitere Mechanismen aufzudecken, die die Zellen in die Differenzierungsrichtung zu Osteoblasten oder Chondrozyten lenkt. Es könnte untersucht werden, ob weitere Transkriptionsfaktoren in die Entwicklung der Vorläuferzellen eingreifen und die Expression der gewebespezifischen Marker reguliert.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein *in vitro* Embryotoxizitätsmodell vorgestellt, das auf der Expressionsanalyse molekularer Markergene verschiedener Differenzierungsendpunkte beruht. Dieses experimentelle Modell benutzt zwei permanente Zelllinien, embryonale Stammzellen und 3T3 Fibroblasten, so dass keine schwangeren Tiere zu seiner Durchführung getötet werden müssen. Basierend auf dem klassischen Embryonalen Stammzell Test (EST) nach Spielmann et al. [1997], der die Zytotoxizität einer Substanz der Störung der Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten, basierend auf der mikroskopischen Auswertung der kontrahierenden Kardiomyozyten, gegenüberstellt, wurde zusätzlich die Störung anderer Differenzierungswege zu Nervenzellen, Osteoblasten und Chondrozyten analysiert. Die Übertragung der semiquantitativen mikroskopischen Auszählung der kontrahierenden Areale auf die quantitative Expressionsebene macht den EST sensitiver und objektiver. Die Testdauer verkürzte sich für den klassischen Endpunkt Herz von 10 auf 8 Tage, denn zu diesem Zeitpunkt war die Expression des als herzspezifisches Markergen identifizierten „Myosin Heavy Chain“ (MHC) am höchsten.

Die Betrachtung von Nervenzellen, Osteoblasten und Chondrozyten im erweiterten EST, erforderte die Entwicklung von Differenzierungsprotokollen für diese Zelltypen.

Die Induktion von Nervenzellen über Retinolsäure wurde der Induktion über Linienselektion gegenübergestellt, um die geeignetere Induktionsmethode zu identifizieren. Die entstandenen Nervenzellen wurden mit immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden nachgewiesen. Das Protokoll über Linienselektion bietet den Vorteil, dass zur Induktion keine per se teratogene Substanz benutzt wird. Das als neuronales Markergen identifizierte NFM zeigt an Tag 14 der Kultur die höchste Expression, so dass die Zellen für den Embryotoxizitätstest (Endpunkt Nervenzellen) zwei Wochen kultiviert wurden.

Die Entwicklung neuer Differenzierungsprotokolle zur Osteoblasten- und Chondrozyteninduktion zeigten, dass exogene Faktoren für die Ausbildung charakteristischer Zelleigenschaften notwendig waren. Es konnte nachgewiesen werden, dass die ES Zellen zu Osteoblasten differenzierten, wenn das Medium ab Tag 5 der Kultur  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und  $VD_3$  enthielt, und dass die chondrogene Differenzierung unter Gabe von BMP-2 (Tag 3 bis zum Ende der Kulturdauer),  $TGF\beta_1$  (Tag 3-5), Insulin und Ascorbinsäure (jeweils ab Tag 5 bis zum Ende der Kulturdauer) stattfand. Histochemische Färbungen wie Alizarinrot S und von Kossa zeigten die Anwesenheit mineralisierter Zellen und mit Alcian Blau Färbung ließen sich knorpelspezifische Proteoglycane nachweisen. Immunhistochemisch ließen sich Osteopontin, Osteonectin, Bone Sialoprotein und Osteocalcin in Osteoblasten und Kollagen Typ II und Aggrecan in Chondrozyten über Antikörper nachweisen. Als Markergene konnten Osteocalcin für Osteoblasten und Aggrecan

für Knorpel identifiziert werden, denn ihre Expression war auf das jeweilige Gewebe limitiert. Als Zeitpunkt der Auswertung des EST unter Anwendung der Differenzierungsprotokolle für Knochen- oder Knorpelgewebe, wurden die Kulturtage 30 und 32 festgelegt, denn die Markergene zeigten dort ihre höchste Expression.

Mit sechs ausgewählten Modellsubstanzen konnte eine erste Einschätzung des Potentials des erweiterten EST gemacht werden. Die Einführung der neuen Endpunkte konnte die Sensitivität des Embryotoxizitätstests erhöhen und die quantitative Expressionsanalyse machte den Test objektiver. VPA und Thalidomid, die mit dem klassischen Modell falsch negativ eingestuft wurden, wurden auf Grund ihrer Wirkung auf spezifische Endpunkte mit dem erweiterten Testmodell richtig eingestuft. Die Analyse der Störung spezifischer Differenzierungslinien erlaubt Aussagen über die Mechanismen der embryotoxischen Wirkung und könnte Vorraussagen über das teratogene Schädigungsbild ermöglichen. Somit wurde ein Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung eines aussagekräftigen *in vitro* Embryotoxizitätstest geschaffen.

## 8 Literaturverzeichnis

- Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G (1993). Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol* 12, 871-880
- Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R (2001). TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and Osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 20, 2254-2272
- Alouani S, Ketchum S, Rambosson C, Eistetter HR (1993) Transcriptional activity of the neuron-specific enolase (NSE) promoter in murine embryonic stem (ES) cells and preimplantation embryos. *Eur J Cell Biol* 62(2), 324-332
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410
- Angelov DN, Arnhold S, Andressen C, Grabsch H, Puschmann M, Hescheler J, Addicks K (1998). Tempospatial relationships between macroglia and microglia during in vitro differentiation of murine stem cells. *Dev Neurosci* 20, 42-51
- Antin PB, Yatskievych T, Dominguez JL, Chieffi P (1996). Regulation of avian precardiac mesoderm development by insulin and insulin-like growth factors. *J Cell Physiol* 168, 42-50
- Ariyuki F, Higaki K, Yasuda M (1980). A study of fetal growth retardation in teratological tests: an examination of the relationship between body weight and ossification of coccygeal vertebrae in mouse and rat fetuses. *Teratology* 22, 43-49
- Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB (1990) Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 143(2), 213-221
- D'Arville C, Mason RM (1983). Effects of serum and insulin on hyaluronate synthesis by cultures of chondrocytes from the Swarm rat chondrosarcoma. *Biochim Biophys Acta* 760, 53-60
- Aubin JE, Liu F (1996) The osteoblast lineage in: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds) *Principles of bone biology*. Academic Press, San Diego, Ca, U.S.A., pp 51-67
- Auernhammer CJ, Melmed S (2000). Leukemia- inhibitory factor- neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr Rev* 21, 313-345
- Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI (1994). From embryonal carcinoma cells to neurons: The P19 pathway. *BioEssays* 16, 323-348
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168, 342-357
- Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI (1996). Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 223, 691-694
- Bansal R, Winkler S, Bheddah S (1999). Negative Regulation of oligodendrocyte differentiation by galactosphingolipids. *J Neurosci* 19, 7913-7924
- Barres BA, Lazar M, Raff MC (1994). A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids, and Retinoic acid in timing oligodendrocyte differentiation. *Development (Camb)* 120, 1097-1108
- Bartoshesky LE, Bhan I, Nagpaul K, Pashayan H (1982). Severe cardiac and ophthalmologic malformations in an infant exposed to diphenylhydantoin in utero. *Pediatrics* 69, 202-203
- Bayer SA, Altman J (1991). *Neocortical development*. First Edition. New York, Raven Press.
- Beck GR, Zerler B, Moran E (2000). Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *PNAS USA* 97(15):8352-8357
- Bembenek ME, Willis DH, Liberti JP (1982). *Biochem Biophys Res Commun* 106, 338-345
- Benke PJ (1984). The isoretinoin teratogen syndrome. *JAMA* 251, 3267-3269



- Bernard GW (1978). Ultrastructural localization of alkaline Phosphatase in initial intramembranous osteogenesis. *Clin Orthop* 135, 218-255
- Berrard S, Faucon Biguet N, Houhou L, Lamouroux A, Mallet J (1993). Retinoic acid induces cholinergic differentiation of cultured newborn rat sympathetic neurons. *J Neurosci Res* 35, 382-389
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, deCrombrughe B (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22, 85-89
- Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, deCrombrughe B (2001). Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *PNAS USA* 98, 6698-6703
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG (1990). Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and Decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38, 1549-1563
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG (1991). Expression of bone Sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int* 49, 421-426
- Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT (1972). Localisation of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43, 429-435
- Bloom GS, Vallee RB (1983). Association of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) with microtubules and intermediate filaments in cultured brain cells. *J Cell Biol* 96, 1523-1531
- Bögler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M (1990). Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type2 astrocyte (O2A) progenitor cells. *PNAS USA* 87, 6368-6372
- Bosi G, Evangelisti R, Valeno V, Carinci F, Pezzetti F, Calastrini C, Bodo M, Carinci P (1998). Diphenylhydantoin affects glycosaminoglycans and collagen production by human fibroblasts from cleft palate patients. *J Dent Res* 77, 1613-1621
- Bost F, Caron L, Marchetti I, Dani C, Le Marchand-Brustel Y, Binetruy B (2002). Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem J* 361, 621-627
- Bounelis P, Daniel JC (1983). The effect of ascorbate on embryonic chick sternal chondrocytes cultured in agarose. *Tissue Cell* 15, 683-693
- Boucher D, Delost P (1964). Developpement post-natal des descendants issus de meres traitees par la penicilline au cours de la gestation chez la souris. *C R Soc Biol* 158, 528-532
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256
- Brown NA, Kao J, Fabro S (1980). Teratogenic potential of valproic acid. *Lancet* 1, 660-661
- Brown NA, Spielmann H, Bechter R, Flint OP, Freeman SJ, Jelinek RJ, Koch E, Nau H, Newall DR, Palmer AK, Renault J-Y, Repetto MF, Vogel R, Wiger R (1995). Screening chemicals for reproductive toxicity: the current alternatives. *ATLA* 23, 868-882
- Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR (1992). Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 3(10):1169-1180
- Brown D, Wagner D, Li X, Richardson JA, Olson EN (1999). Dual role of the basic helix-loop-helix transcription factor Scleraxis in mesoderm formation and chondrogenesis during mouse embryogenesis. *Development* 126, 4317-4329
- Bruckner A, Lee YJ, O'Shea KS, Henneberry RC (1983). Teratogenic effects of valproic acid and diphenylhydantoin on mouse embryos in culture. *Teratology* 27, 29-42
- Butler WT, Ridall AL, McKee MD (1996) Osteopontin in: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds) *Principles of bone biology*. Academic Press, San Diego, pp.167-181
- Butler WT (1989). The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* 23, 123-126

- Buttery LDK, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SPF, Episkopou V, Polak JM (2001). Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Engineering* 7, 89-99
- Caceres A, Banker G, Steward O, Binder L, Payne M (1984). MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Dev Brain Res* 13, 314-318
- Calhoun M, Jucker M, Martin LJ, Thinkaran G, Price DA, Mouton PR (1996). Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol* 25, 821-828
- Campos-Ortega JA (1996). Ontogenie des Nervensystems und der Sinnesorgane. In: Dudel J, Menzel R, Schmidt R (eds). *Neurowissenschaft – vom Molekül zur Kognition*. Springer, Heidelberg, pp 63-86
- Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P (1995). Chondrocyte differentiation. *Int Review Cytol* 159, 265-358
- Caplan AI (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthopaedic Res* 9, 641-650
- Carden MJ, Schlaepfer WW, Lee VM (1985). Two stage expression of neurofilament peptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J Neurosci* 7, 3489-3504
- Castagnola P, Bet P, Quarto R, Gennari M, Cancedda R (1991). CDNA cloning and gene expression of chicken osteopontin. *J Biol Chem* 266, 9944-9949
- Castagnola P, Dozin B, Moro G, Cancedda R (1988). Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation in vitro. *J Cell Biol* 106, 461-467
- Cattaneo E, McKay RG (1990). Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347, 762-765
- Celeste AJ, Rosen V, Buecker JL, Kriz R, Wang EA, Wozney JM (1986). Isolation of the human gene for gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *EMBO J* 5, 1885-1890
- Cervello M, D'Amelio L, Tesoro V, Rougon G, Matranga V (1997). Expression of PSA-N-CAM in human neuroblastoma cells induced to neuronal differentiation by retinoic acid. *Eur J Cell Biol* 73, 270-275
- Chea KS, Lau ET, Au PK, Tam PP (1991). Expression of the mouse alpha1 (II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. *Development* 111, 945-953
- Chea KS, Au PKC, Lau ET, Au PK, Little PFR, Stubbs L (1991b). The mouse Col2a-1 gene is highly conserved and is linked to Int-1 on Chromosome 15. *Mammalian Genome* 1, 171-183
- Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Harris SE (1998). Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* 142, 295-305
- Chen J, Zhang Q, McCulloch CAG, Sodek J (1991). Immunohistochemical localization of bone Sialoprotein in foetal porcine bone tissues: comparisons with secreted phosphoprotein 1 (SSP-1, osteopontin) and SPARC (osteonectin). *Histochem J* 23, 281-289
- Chen J, Shapiro HS, Sodek J (1992) Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Miner Res* 7(8):987-997
- Chen U, Kosco M, Staerz U (1992). Establishment and characterization of lymphoid and myeloid mixed-cell populations from mouse late embryoid bodies, embryonic-stem-cell fetuses. *PNAS USA* 89, 2541-2545
- Chen TL, Cone CM, Feldman D (1983). Effects of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and glucocorticoids on the growth of rat and mouse osteoblast-like bone cells. *Calcif Tissue Int* 35(6), 806-811
- Chen TL, Feldman D (1985). Retinoic acid modulation of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 receptors and bioresponse in bone cells: species differences between rat and mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 132, 74-80
- Chen TL, Fry D (1999). Hormonal regulation of the osteoblastic phenotype expression in neonatal murine calvarial cells. *Calcif Tissue Int* 64, 304-309
- Chen P, Carrington JL, Hammonds RG, Reddi AH (1991). Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2. *Exp Cell Res* 195, 509-515

- Chentoufi J, Hott M, Lamblin D, Buc-Caron MH, Marie PJ, Kellermann O (1993) Kinetics of in vitro mineralization by an osteogenic clonal cell line (C1) derived from mouse teratocarcinoma. *Differentiation* 53, 181-189
- Choo D, Sanne JL, Wu DK (1998). The differential sensitivities of inner ear structure to retinoic acid during development. *Dev Biol* 204, 136-150
- Chu ML, Williams CJ, Pepe G, Hirsch JL, Prockop DJ, Ramirez F (1983). Internal deletion in a collagen gene in an perinatal lethal form of osteogenesis imperfecta. *Nature* 304, 78-80
- Collazo D, Takahashi H, McKay RDG (1992). Cellular targets and trophic functions of neurotrophin-3 in the developing rat hippocampus. *Neuron* 9, 643-656
- Collignon J (1992). Study of a new family of genes related to the mammalian testis determining gene. PhD thesis, CNAALondon
- Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1996). A comparison of the properties of sox-3 with sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 122, 509-520
- Consigli SA, Joseph-Silverstein J (1991). Immunolocalization of basic fibroblast growth factor during chicken cardiac development. *J Cell Physiol* 146, 379-385
- Cote F, Collard J-F, Julien J-P (1993). Progressive neuropathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* 73, 35-46
- Cserjesi P, Brown D, Ligon KL, Lyons GE, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Olson EN (1995). Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* 1231, 1099-1110
- Dagg CP (1960). Sensitive stages for the production of developmental abnormalities in mice with 5-fluorouracil. *Am J Anat* 106, 89-96
- Dahlstrand J, Lardelli M, Lehndahl U (1995). Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 84, 109-129
- Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, V8illageois P, Darimont C, Ailhaud G (1997). Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 110, 1279-1285
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV (1997). Targeted disruption of Decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 136, 729-743
- Davies JE (1996). In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec* 245(2), 426-445
- Degitz SJ, Morris D, Foley GL, Francis BM (1998). Role of TGF- $\beta$  in RA-induced cleft palate in CD-1 mice. *Teratology* 58, 197-204
- Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E (2000). Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* 105, 915-923
- Denhardt DT, Guo X (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7(15), 1475-1482.
- Denhardt DT, Noda M (1998). Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 30-31, 90-102
- Denker AE, Nicoll SB, Tuan RS (1995). Formation of cartilage-like spheroids by micromass culture of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation* 59, 25-34
- Dewulf N, Verschueren K, Lonnoy O, Moren A, Grimsby S, Spiegle KV, Miyazono K, Huylebroeck D (1995). Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology* 136, 2652-2663
- Dickson I, Walls J (1985). Vitamin A and bone formation. Effect of an excess of retinal on bone collagen synthesis in vitro. *Biochem J* 226(3), 789-795
- Dinsmore J, Ratcliff J, Jacoby D, Wunderlich M, Lindberg C (1998). Embryonic stem cells as a model for studying regulation of cellular differentiation. *Theriogenology* 49, 145-151

- Doetschmann TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87, 27-45
- Doniach T (1995). Basic FGF as an inducer of anteroposterior neural pattern. *Cell* 83, 1067-1070
- Dozin B, Quarto R, Campanile G, Cancedda R (1992). In vitro differentiation of mouse embryo chondrocytes: requirement for ascorbic acid. *Eur J Cell Biol* 58, 390-394
- Drab M, Haller H, Bychkow R, Erdmann B, Lindschau C, Haase H, Luft C, Wobus AM (1997). From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting vascular smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *FASEB J* 11, 905-915
- D'Souza RN, Aberg T, Gaikward J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I (1999). Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 126, 2911
- Ducy P, Debois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Grundberg C, Bradley A, Karsenty G (1996a). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Grundberg C, Bradley A, Karsenty G (1996b). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448-452
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5):747-754
- Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G (1999). A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 13, 1025
- Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289 (5484), 1501-1504
- Ducy P (2000). Cbfa1: A molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219, 461-471
- Duprez D, Bell EJ, Richardson MK, Archer CW, Wolpert L, Brickell PM, Francis-West PH (1996). Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb bud. *Mech Dev* 57, 145-157
- Dusso AS, Brown AJ (1999). Mechanism of vitamin D action and its regulation. *Am J Kidney Dis* 32, S13-24
- Ecarot-Charrier B, Glorieux FH, van der Rest M, Pereira G (1983). Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol* 96(3):639-643
- Eckstein-Ludwig U, Fei J, Schwarz W (1999). Inhibition of uptake, steady-state currents, and transient charge movements generated by the neuronal GABA transporter by various anticonvulsant drugs. *Br J Pharmacol* 128, 92-102
- Eclancher F, Perraud F, Faltin J, Labourdette G, Sensenbrenner M (1990). Reactive astrogliosis after basic fibroblast growth factor (bFGF) injection in injured neonatal rat brain. *GLIA* 3, 502-509
- Eddleston M, Mucke L (1993). Molecular profile of reactive astrocytes – implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 15-36
- Eichele G (1989). Retinoids and vertebrate limb pattern formation. *Trends Genet* 5, 246-251
- Eluma F, Sucheston M, Hayes T, Paulson R (1984). The teratological effects of drugs: Diphenylhydantoin (DPH), carbamazepine (CMZ), sodium valproate (NaV), dosage levels and time of drug administration on the craniofacial development in the CD1 mouse fetus. *J Craniofac Genet Dev Biol* 4, 191-210
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25, 1439-1451
- Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T (2000). Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 275, 8695-8702
- Esmon CT, Sadouski JA, Suttle JW (1975). A new carboxylation reaction: the vitamin K-dependent incorporation of H-<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> into prothrombin. *J Biol Chem* 250, 4744-4748
- Evans MJ, Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156

- Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ (1982). A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 9, 247-248
- Feng JQ, Harris MA, Ghosh-Choudhury N, Feng M, Mundy GR, Harris SE (1994). Structure and sequence of mouse bone morphogenetic protein-2 gene (BMP-2): comparison of the structures and promotor regions of BMP-2 and BMP-4 genes. *Biochim Biophys Acta* 1218, 221-224
- Fernhoff PM, Lammer EJ (1984). Craniofacial features of isoretinoin embryopathy. *J Pediatr* 105, 595-597
- Finley MF, Kulkarni N, Huettner JE (1996). Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J Neurosci* 16, 1056-1065
- Finnel RH (1981). Phenytoin-induced teratogenesis: a mouse model. *Science* 211, 483-484
- Fisher LW, Whitson SW, Avioli LV, Termine JD (1983). Matrix Sialoprotein of developing bone. *J Biol Chem* 258, 12723-12727
- Fishman MC, Chien KR (1997). Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development (Camb.)* 124, 2099-2117
- Fitzpatrick DR, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst R (1990). Differential expression of TGF- $\beta$  isoforms in murine palatogenesis. *Development* 109, 585-595
- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* 108, 3181-3188
- Franceschi RT, Iyer BS (1992) Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 7(2):235-246
- Franzen A, Heinegard D (1985). Isolation and characterization of two sialoproteins only in bone calcified matrix. *Biochem J* 232, 715-724
- Frei K, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A (1985). Astrocytes of the brain synthesize interleukin-3 factors. *J Immunol* 135, 4044-4047
- Frendo JL, Xiao G, Fuchs S, Franceschi RT, Karsenty G, Ducy P (1998) Functional hierarchy between two OSE2 elements in the control of osteocalcin gene expression in vivo. *J Biol Chem* 273(46):30509-30516
- Fujita T, Izumo N, Fukuyama R, Meguro T, Nakamuta H, Kohno T, Koida M (2000a). Phosphate provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 348-352
- Fujita T, Fukuyama R, Izumo N, Meguro T, Nakamuta H, Koida M (2000b). Enhanced Cbfa1 transactivation as a basic mechanism to trigger bone anabolic action of PTH. *J Bone Miner Res* 15 (Suppl1), S170
- Funk SE, Sage EH (1993). Differential effects of SPARC, and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 154, 53-63
- Furukawa S, Furukawa Y, Satoyoshi E, Hayashi K (1986). Synthesis and secretion of nerve growth factor by mouse astroglial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 136, 57-63
- Galotto M, Campanile G, Robino G, Cancadda FD, Bianco P, Cancedda R (1994). Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation into osteoblast-like cells and participate in the initial bone formation in developing chick embryo. *J Bone Miner Res* 9, 1239-1249
- Gajovic S, St-Onge L, Yokota Y, Gruss P (1997). Retinoic acid mediates Pax6 expression during in vitro differentiation of embryonic stem cells. *Differentiation* 62, 187-192
- Gardner EE, Dahl D, Bignami A (1984). Formation of 10 nm filaments from the 150 K-dalton neurofilament protein in vitro. *J Neurosci Res* 11, 145-155
- Gao YH, Shinki T, Yuasa T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, Yamaguchi A (1998). Potential role of Cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun* 252(3), 697-702
- Geiser AG, Burmester JK, Webbink R, Roberts AB, Sporn MB (1992). Inhibition of growth by transforming growth factor-beta following fusion of two nonresponsive human carcinoma cell lines. Implication of the type II receptor in growth inhibitory responses. *J Biol Chem* 267, 2588-2593

- Gensburger C, Labourdette G, Sensenbrenner M (1987). Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro. *FEBS Lett* 217, 1-5
- Genschow E, Scholz G, Brown NA, Piersma A, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K, Spielmann H (2000). Development of prediction models for three in vitro embryotoxicity tests in an ECVAM validation study. *In Vitro Mol Toxicol* 13, 51-65
- Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Seiler A, Brown NA, Piersma A, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K (2002). The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *ATLA* 30, 1-26
- Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP (1994). Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12, 443-457
- Gerstenfeld LC, Chipman SD, Glowacki J, Lian JB (1987) Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev Biol* 122(1):49-60
- Gerstenfeld LC, Landis WJ (1991). Gene expression and extracellular matrix ultrastructure of a mineralizing chondrocyte cell culture system. *J Cell Biol* 104, 1435-1441
- Ghosh A, Greenberg ME (1995). Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* 15, 89-103
- Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J (1991). A role for Osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 45, 292-302
- Glumoff V, Savontaus M, Vehanen J, Vuorio E (1994). Analysis of aggrecan and tenascin gene expression in mouse skeletal tissues by northern and in situ hybridization using specific cDNA probes. *Biochim Biophys Acta* 1219, 613-622
- Godin Y, Heiner L, Mark J, Mandel P (1969). Effects of DI-n-propylacetate, an anticonvulsive compound, on GABA Metabolism. *J Neurochem* 16, 869-873
- Goldberg HA, Hunter GK (1995). The inhibitory activity of osteopontin on hydroxyapatite formation in vitro. *Ann NY Acad Sci* 760, 305-308
- Gonzalez-Billault C, Engelke m, Jimenez-Mateos EM, Wandosell F, Cacares A, Avila J (2002). Participation of structural microtubule-associated Proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci Res* 67, 713-719
- Gosecki-Sone M, Iimura T, Takeda K, Nifuji A, Ogata Y, Yanagishita M, Oida S (1999). Expression of mRNA encoding tissue-nonspecific alkaline Phosphatase in human dental tissues. *Calcif Tissue Int* 64, 160-162
- Giucheux J, Palmer G, Shukunami C, Hiraki Y, Bonjour JP, Caverzasio J (2000]. A novel in vitro culture system for analysis of functional role of phosphate transport in endochondral ossification. *Bone* 27, 69-74
- Grigoriadis A, Petkovich PM, Rosenthal EE, Heersche JNM (1986). Modulation by Retinoic acid of 1,25-dihydroxyvitamin D3 effects on alkaline Phosphatase activity and parathyroid hormone responsiveness in an osteoblast-like osteosarcoma cell line. *Endocrinology* 119, 932-939
- Gu J, Royland JE, Wiggins RC, Konat GW (1997). Selenium is required for normal upregulation of myelin genes in differentiating oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 47, 626-635
- Guan K, Furst DO, Wobus AM (1999). Modulation of sarcomere organization during embryonic stem cell-derived cardiomyocyte differentiation. *Eur J Cell Biol* 78, 813-823
- Haas AR, Tuan RS (1999). Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. *Differentiation* 64, 77-89
- Hagiwara M, Inoue A, Yamaguchi A, Yokose S, Furuya M, Tanaka S, Hirose S (1996). CGMP produced in response to ANP and CNP regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Am J Physiol* 270, C1311-C1318
- Hakeda Y, Ikeda E, Kurihara N, Nakatani Y, Maeda N, Kumegawa M (1985). Induction of osteoblastic cell differentiation by forskolin. Stimulation of cyclic AMP production and alkaline Phosphatase activity. *Biochim Biophys Acta* 838, 49-53

- Hall BK, Miyake T (1992). The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 186, 107-124
- Han Y, Dennis JE, Cohen-Gould L, Bader DM, Fishman DA (1992). Expression of sarcomeric myosin in the presumptive myocardium of chicken embryos occurs within six hours of myocyte commitment. *Dev Dyn* 193, 257-265
- Haneji T, Kurihara N, Ikeda K, Kumegawa M (1983). 1 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 and analogues of vitamin D3 induce alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria. *J Biochem* 94(4), 1127-1132
- Hanson JW, Smith DW (1975). The fetal hydantoin syndrome. *J Pediatr* 87, 285-290
- Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M (1999). Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 274, 6972-6978
- Harbison RD, Becker BA (1969). Relation of dosage and time of administration of diphenylhydantoin to its teratogenic effect in mice. *Teratology* 2, 305-312
- Hardy RJ, Friedrich VL Jr (1996). Progressive remodeling of the oligodendrocyte process arbor during myelinogenesis. *Dev Neurosci* 18, 243-254
- Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, Sebatini M, Dalla S, Feng JQ, Ghosh-Choudhury N, Wozney JM, Mundy GR (1994). *J Bone Miner Res* 9, 389-394
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Grundberg, CM (1989). Osteocalcin and matrix gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone. In *Physiol. Rev.* 69, 990-1046
- Hardingham TE (1979). The role of link protein in the structure of cartilage Proteoglycan aggregates. *Biochem J* 177, 237-247
- Healy C, Uwanogho D, Sharpe PT (1999). Regulation and role of Soc9 in cartilage formation. *Dev Dyn* 215, 69-78
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-994
- Heinenon OP, Sione D, Shapiro S (1977). Birth defects and drugs in pregnancy. John Wright
- Heinegard D, Paulsson M (1984). In: Piez KA, Reddi AH (eds). *Extracellular matrix biochemistry*. Elsevier, New York, p. 277
- Heinegard D, Pimentel ER (1992). Cartilage matrix proteins. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC (eds). *Articular cartilage and osteoarthritis*. Raven Press, Ltd, New York
- Henion PD, Weston JA (1994). Retinoic acid selectively promotes the survival and proliferation of neurogenic precursors in cultured neuronal crest cell populations. *Dev Biol* 161, 243-250
- Heuer J, Bremer S, Pohl I, Spielmann H (1993). Development of an in vitro embryotoxicity test using murine embryonic stem cell cultures. *Toxicology in Vitro* 7, 551-556
- Heuer J, Graeber IM, Pohl I, Spielmann H (1994). Culture system for the differentiation of murine embryonic stem cells – a new approach to in vitro testing for embryotoxicity and for developmental immunotoxicology. In: *European Medicines Research* (ed. Fracchia GN), IOS Press, Amsterdam, pp 134-145
- Hinds L, Katz RL (1971). Dissociation of traceobronchial and cardiac effects of some beta-adrenergic stimulants. *Anesthesiology* 34, 445-449
- Hirokawa N (1991). Molecular architecture and dynamics of the neuronal cytoskeleton. In: Burgoyne RD (ed). *The neuronal cytoskeleton*. Wiley-Liss, New York, pp 5-74
- Hisanaga S, Hirokawa N (1991). Molecular architecture of neurofilament in vitro reassembly process of neurofilament-L protein. *J Mol Biol* 211, 871-882
- Hockfield S, McKay RDG (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5, 3310-3328
- Hodgkinson JE, Davidson CL, Beresford J, Sharpe PT (1993). Expression of a human homeobox-containing gene is regulated by 1,25(OH)2D3 in bone cells. *Biochim Biophys Acta* 1174, 11-16
- Hogan BL (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10, 1580-1594

- Hoh JF, McGrath PA, Hale PT (1978). Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. *J Mol Cell Cardiol* 10, 1053-1076
- Holland PW, Harper SJ, McVey JH, Hogan BL (1987) In vivo expression of mRNA for the  $\text{Ca}^{++}$ -binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol* 105(1):473-482
- Hoshi K, Kemmotsu S, Takeucji Y, Amizuka N, Ozawa H (1999). The primary calcification in bone s follows removal of Decorin and fusion of collagen fibrils. *J Bone Miner Res* 14, 273-280
- Ishida H, Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN (1993) Characterization of the 1,25-(OH) $2\text{D}_3$ -induced inhibition of bone nodule formation in long-term cultures of fetal rat calvaria cells. *Endocrinology* 132(1):61-66
- Iruela-Arispe ML, Lane TF, Redmond D, Reilly M, Bolender RP, Kavanagh TJ, Sage EH (1995). Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis in vivo. *Mol Biol Cell* 6, 327-343
- Izumi T, Scully SP, Hyedemann A, Bolander ME (1992). Transforming growth factor- $\beta$ 1 stimulates type II collagen expression in cultured periosteum-derived cells. *J Bone Miner Res* 7, 115-121
- Johansson BM, Wiles MV (1995). Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol* 15, 141-151
- Jones-Villeneuve EMV, McBurney MW, Rogers KA, Kallins VI (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol* 94, 253-262
- Jonk LJ, de Jonge ME, Kruyt FA, Mummery CL, van der Saag PT, Kruijer W (1992). Aggregation and cell cycle dependent Retinoic acid receptor mRNA expression in P19 embryonal carcinoma cells. *Mech Dev* 36, 165-172
- Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME (1990). Transforming growth factor- $\beta$  and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 110, 2195-2207
- Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, Davis CA, Rossant J (1991). Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. *Science* 251, 1239-1243
- Julien JP, Meyer D, Flavell D, Hurst J, Grosveld F (1986). Cloning and developmental expression of the murine neurofilament gene family. *Mol Brain Res* 1, 243-250
- Kähäri V-M, Larjava H, Uitto J (1991). Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 266, 10608-10615
- Kanzler B, Kuschert SJ, Liu Y-M, Mallo M (1998). Hoxa-2 restricts the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area. *Development* 125, 2587-2597
- Kao J, Brown NA, Schmid B, Goulding EH, Fabro S (1981). Teratogenicity of valproic acid: in vivo and in vitro investigations. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 1, 367-382
- Karsenty G (1999). The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* 13 (23), 3037-3051
- Kastner P, Krust A, Mendelsohn C, Garnier JM, Zelent A, Leroy P, Staub A, Chambon P (1990). Murine isoforms of Retinoic acid receptor  $\gamma$  with specific patterns of expression. *PNAS USA* 87, 2700-2704
- Kasugai S, Todescan RJ, Nagata T, Yao KL, Butler WT, Sodek J (1991). Expression of bone matrix proteins associated with mineralised tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of Dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J Cell Physiol* 147, 111-120
- Koike T, Suzuki F, Nishii Y, Sato K (1990). Role of 1,25 dihydroxycholecalciferol in growth plate cartilage: Inhibition of terminal differentiation of chondrocytes during endochondral and intramembranous ossification. *PNAS USA* 87, 6522-6526
- Kelley MW, Turner JK, Reh TA (1994). Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors in vitro. *Development* 120, 2091-2101
- Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol* 13, 473-486



- Kellermann O, Buc-Caron MH, Marie PJ, Lamblin D, Jacob F (1990). An immortalized cell line derived from mouse teratocarcinoma is able to mineralize in vitro. *J Cell Biol* 110, 123-132
- Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G (2001). Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem* 276, 7101-7107
- Kilpatrick TJ, Bartlett PF (1993). Cloning and growth of multipotential neuronal precursors: requirements for proliferation and differentiation. *Neuron* 10, 255-265
- Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S (1999). Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev* 80, 159-170
- Kimelberg HK, Katz DM (1985). High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. *Science* 228, 889-891
- Kingsley DM (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8, 133-146
- Kitaoka E, Satomura K, Hayashi E, Yamanouchi K, Tobiume S, Kume K, Obinata M, Nagayama M (2001). Establishment and characterization of chondrocyte cell lines from the costal cartilage of SV40 large T antigen transgenic mice. *J Cell Biochem* 81, 571-582
- Kivirikko KI, Myllylä M (1984). In Piez KA and Reddi AH: "Extracellular Matrix Biochemistry", p. 83. Elsevier, New York
- Kleppisch T, Wobus AM, Strübing C, Hescheler J (1993). Voltage-dependent L-type Ca channels and a novel type of non-selective cation channel activated by cAMP-dependent phosphorylation in mesoderm-like (MES-1) cells. *Cell Signal* 5, 727-734
- Knaus P, Betz H, Rehm H (1986). Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *J Neurochem* 47, 1302-1304
- Kochhar DM (1967). Teratogenic activity of Retinoic acid. *Acta Pathol Microbiol Scand* 70, 398-404
- Kochhar DM (1973). Limb development in mouse embryos. *Teratology* 7, 289-298
- Kochhar DM (1975). The use of in vitro procedures in teratology. *Teratology* 11, 273-287
- Kochhar DM (1977). Cellular basis of congenital limb deformity induced in mice by vitamin A. In: Bergsma D, Lenz W (eds). *Birth defects original article series* 13, New York, Alan R Liss, Inc, pp 111-154
- Komaki M, Katagiri T, Suda T (1996). Bone morphogenetic protein-2 does not alter the differentiation pathway of committed progenitors of osteoblasts and chondroblasts. *Cell Tissue Res* 284, 9-17
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764
- Kosher RA, Kulyk WM, Gay S (1986). Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J Cell Biol* 102, 1151-1156
- Koshihara Y, Hoshi K, Ishibashi, Shiraki M (1996). Vitamin K<sub>2</sub> promotes 1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>- induced mineralization in human periosteal osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 59, 466-473
- Koshihara Y, Takamori R, Nomura K, Sugiura S, Kurozumi S (1991). Enhancement of in vitro mineralization in human osteoblasts by a novel prostaglandin A1 derivative TEI-3313. *J Pharm Exp Ther* 258, 1120-1126
- Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Müller PK, Rohwedel J (2000). Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mechanisms of Development* 92, 193-205
- Krusius T, Ruoslahti E (1986). Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *PNAS USA* 83, 7683-7687
- Kulyk WM, Rodgers BJ, Greer K, Kosher RA (1989). Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor  $\beta$ . *Dev Biol* 135, 424-430
- Labosky PA, Barlow DP, Hogan BLM (1994). Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development* 120, 3197-3204

- Laiho M, Weis FMB, Massague J (1990). Concomitant loss of transforming growth factor- $\beta$  receptor types I and II in cell mutants resistant to TGF- $\beta$ . *J Biol Chem* 265, 18518-18524
- Laitinen M, Halttunen T, Jortikka L, Teronen O, Sorsa T, Lindholm TS (1998). The role of transforming growth factor-beta on retarded osteoblastic differentiation in vitro. *Life Sci* 64, 847-858
- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnash N, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW, Lott IT, Tichard JM, Sun SC (1985). Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 313, 837-841
- Lane JM, Weiss C (1975). Review of articular cartilage collagen research. *Arthritis Rheum* 18, 553-562
- Lane TF, Iruela-Arispe ML, Johnson RS, Sage EH (1994). SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *J Cell Biol* 125, 929-943
- Lane TF, Sage EH (1994). The biology of SPARC, protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 8, 163-173
- Laping NL, Teter B, Nichols NR, Rozovsky I, Finch CE (1994). Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathology* 1, 259-275
- Laschinski G, Vogel R, Spielmann H (1991). Cytotoxicity test using blastocyst-derived euploid embryonal stem cells: a new approach to in vitro teratogenesis screening. *Reproductive Toxicol* 5, 57-64
- Lawler S, Candia AF, Ebner R, Shum L, Lopez AR, Moses HL, Wright CVE, Derynck R (1994). The murine type II TGF- $\beta$  receptor has a coincident embryonic expression and binding preference for TGF- $\beta$ 1. *Development* 120, 165-175
- Lawrence DA (1996). Transforming growth factor- $\beta$ : a general review. *Eur Cytokin Netw* 7, 363-374
- Leahy A, Xiong JW, Kuhnert F, Stuhlmann H (1999). Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool.* 284, 67-81
- Leconte L, Semonin O, Zvara A, Boisseau S, Poujeol C, Julien JP, Simonneau M (1995). Both upstream and intragenic sequences of the human neurofilament light gene direct expression of lacZ in neurons of transgenic mouse embryos. *J Mol Neurosci* 5, 273-295
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18, 675-679
- Lefebvre PP, Malgrane B, Staecker H, Moonen G, van de Water TR (1993). Retinoic acid stimulates regeneration of hair cells. *Science* 260, 692-694
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, deCrombrugghe B (1997). Sox9 is a potent activator of the chondrocyte specific enhancer of the pro alpha 1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 17, 2336-2346
- Lehnert SA, Akhurst EJ (1988). Embryonic expression pattern of TGF-beta type-1 RNA suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action. *Development* 104, 263-273
- Lenz W (1966). Malformations caused by drugs in pregnancy. *Am J Dis Child* 112, 99-106
- Leroy P, Krust A, Zelent A, Mendelsohn C, Garnier JM, Pastner P, Dierich A, Chambon P (1991). Multiple isoforms of the mouse Retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by Retinoic acid. *EMBO J* 10, 59-69
- Lewis SA, Villasante A, Sherline P, Cowan NJ (1986). Brain-specific expression of MAP2 detected using a cloned cDNA probe. *J Cell Biol* 102, 2098-2105
- Lian J, Stewart C, Puchacz E, Mackowiak S, Shalhoub V, Collart D, Zambetti G, Stein G (1989) Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression. *PNAS USA* 86, 1143-1147
- Lian JB, Shalhoub V, Aslam F, Frenkel B, Green J, Hamrah M, Stein GS (1997). Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: Dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates Osteocalcin gene expression. *Endocrinology* 138, 2117-2127
- Lichtler A, Stover ML, Angilly J, Kream B, Rowe DW (1989). Isolation and characterization of the rat alpha 1(I) collagen promoter. Regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Biol Chem* 264, 3072-3077
- Lieberburg I, Spinner N, Snyder S, Anderson J, Goldgaber D, Smulowitz M, Carroll Z, Emanuel B, Breitner J and Rubin L (1989). Cloning of a cDNA encoding the rat high molecular weight neurofilament peptide (NF-H): developmental and

- tissue expression in the rat and mapping of its human homologue to chromosome 1 and 22. PNAS USA 86, 2463-2467
- Lieberherr M (1987) Effects of vitamin D3 Metabolites on cytosolic free calcium in confluent mouse osteoblasts. J Biol Chem 262, 13168-13173
- Lien PJ, Banker G, Higgins D (1992). Laminin selectively enhances axonal growth and accelerates the development of polarity by hippocampal neurons in culture. Dev Brain Res 69, 171-197
- Lindhout D, Omtzigt JG, Cornel MC (1992). Spectrum of neural-tube defects in 34 infants prenatally exposed to antiepileptic drugs. Neurology 42, 195-213
- Liu Y, Watanabe H, Nifuji A, Yamada Y, Olson EN, Noda M (1997). Overexpression of a single helix-loop-helix-type transcription factor, scleraxis, enhances aggrecan gene expression in osteoblastic osteosarcoma ROS17/2.8 cells. J Biol Chem 272, 29880-29885
- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. J Cell Biol 155, 157-166
- Loez CA, Olsen ES, Adams JC, Mou K, Denhardt DT, Davis RL (1995). Ospeopontin expression detected in adult cochleae and inner ear fluid. Hear Res 85, 210-220
- Lohmann CH, Bonewald LF, Sisk MA, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z (2000). Maturation state determines the response of osteogenic cells to surface roughness and 1,25-dihydroxyvitamin D3. J Bone Miner Res 15 (6), 1169-1180
- Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1984). Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. J Biol Chem 259, 6437-6446
- Lorente CA, Tassinari MS, Keith DA (1981). The effects of phenytoin on rat development: an animal model system for fetal hydantoin syndrome. Teratology 24, 169-180
- Lou J, Xu F, Merkel K, Manske P (1999). Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo. J Ortho Res 17, 43-50
- Lou J, Tu Y, Li S, Manske PR (2000). Involvement of ERK in BMP-2 induced osteoblastic differentiation of mesenchymal progenitor cell line C3H10T1/2. Biochem Biophys Res Commun 268, 757-762
- Lough J, Barron M, Brogley M, Sugi Y, Bolender DL, Zhu X (1996). Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precordial embryonic mesoderm. Dev Biol 178, 198-202
- Low MG (1987). Biochemistry of the glycosyl-phosphatidinositol membrane protein anchors. Biochem J 244, 1-13
- Lucas PA, Price PA, Caplan AI (1988). Chemotactic response of mesenchymal cells, fibroblasts and osteoblast-like cells to bone Gla protein. Bone 9, 319-323
- Lufkin T, Dierich A, LeMeur M, Mark M, Chambon P (1991). Disruption of the Hox-1.6 homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. Cell 66, 1105-1119
- Luquin S, Naftolin F, Garcia-Segura LM (1993). Natural fluctuations and gonadal hormone regulation of astrocyte immunoreactivity in dentate gyrus. J Neurobiol 24, 913-924
- Luskin, MB (1994). Neuronal cell lineage in the vertebrate central nervous system. FASEB J 8, 722-730
- Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M (1990). Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. J Cell Biol 111, 2427-2436
- Maar TE, Ellerbeck U, Bock E, Nau H, Schousboe A, Berezin V (1997). Prediction of teratogenic potency of valproate analogues using cerebellar aggregation cultures. Toxicology 116, 159-168
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. Tissue Eng 4, 415-428
- Maden M, Holder N (1991). The involvement of Retinoic acid in the development of the vertebrate central nervous system. Development 2 (Suppl), 87-94

- Mahdavi V, Chambers AP, Nadal-Ginard B (1984). Cardiac alpha- and beta-myosin heavy chain genes are organized in tandem. *PNAS USA* 81, 2626-2630
- Mahmoodian F, Gosiewska A, Peterkofsky B (1996) Regulation and properties of bone alkaline phosphatase during vitamin C deficiency in guinea pigs. *Arch Biochem Biophys* 336, 86-96
- Malaval L, Modrowski D, Gupta Antikörper, Aubin JE (1994). Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cultures. *J Cell Physiol* 158, 555-572
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM (1993). Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 191, 41-50
- Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J (1994). Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 75, 233-244
- Maor G, Silbermann M, von der Mark K, Heingard D, Laron Z (1993). Insulin enhances the growth of cartilage in organ and tissue cultures of mouse neonatal mandibular condyle. *Calcif Tissue Int* 52, 291-299
- Marie PJ, Hott m, Garba MT (1985). Contrasting effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on bone matrix and mineral appositional rates in the mouse. *Metabolism* 34(8), 777-783
- Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS* 78, 7634-7638
- Martz F, Failing III C, Blake DA (1977). Phenytoin teratogenesis: correlation between embryopathic effect and covalent binding of putative arene oxide metabolite in gestational tissue. *J Pharmacol Exp Ther* 203, 231-239
- Marusic A, Katavic V, Grcevic D, Lukic IK (1999). Genetic variability of new bone induction in mice. *Bone* 25, 25-32
- Masliah E, Terry RD, Alford M, DeTeresa R (1990). Quantitative Immunohistochemistry of synaptophysin in human neocortex: an alternative method to estimate density of presynaptic terminals in paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 38, 837-844
- Massague J (1992). Receptors for the TGF- $\beta$  family. *Cell* 69, 1067-1070
- Matsumoto T, Igarashi C, Takeuchi Y, Harada S, Kikuchi T, Yamato H, Ogata E (1991). Stimulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 of in vitro mineralization induced by osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Bone* 12, 27-32
- Massey KM (1966). Teratogenic effects of diphenylhydantoin sodium. *J Oral Ther Pharmacol* 2, 380-385
- McBride WG (1961). Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 2, 1358
- McComb RB, Bowers GN, Posen S (1979). *Alkaline Phosphatase*. Plenum, New York
- McKee MD, Nanci A (1996) Osteopontin: An interfacial extracellular matrix protein in mineralised tissues. *Connect Tissue Res* 35, 197-205
- McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA (1990). FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* 5, 603-614
- Meshul CK, Seil FJ, Herndon RM (1987). Astrocytes play a role in regulation of synaptic density. *Brain Res* 402, 139-145
- Metzger JM, Lin W-L, Samuelson LC (1995). Vital staining of cardiac myocytes during embryonic stem cell cardiogenesis in vitro. *Circ Res* 78, 547-552
- Miller JA, Richter JA (1985). Effects of anticonvulsants in vivo on high affinity choline uptake in vitro in mouse hippocampal synaptosomes. *Br J Pharmacol* 84, 19-25
- Miller EJ, Gay S (1987). The Collagens: An Overview and Update. *Methods in Enzymology* 144, 3-41
- Mirkin BL (1971). Diphenylhydantoin: placental transport, fetal localization, neonatal metabolism and possible teratogenic effects. *Pediatr Pharmacol Ther* 78, 329-337
- Miura Y, Galley SH, Commisso CN, Fitzsimmons JS, O'Driscoll SW (1993). Enhancement of periosteal chondrogenesis in vitro: Dose response for TGF $\beta$ . *Orthop Trans* 17, 368
- Morrison NA, Shine J, Fragonas J-C, Verkest V, Mcmenemy L, Eisman JA (1989). 1,25-Dihydroxyvitamin D-responsive element and glucocorticoid repression in the Osteocalcin gene. *Science* 246, 1158-1161
- Morriss GM (1972). Morphogenesis of the malformations induced in rat embryos by maternal hypervitaminosis. *A. J Anat* 113, 241-250

- Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 355
- Murphy DB, Johnson KA, Borisky GG (1977). Role of tubulin-associated proteins in microtubule nucleation and elongation. *J Mol Biol* 117, 273-287
- Muslin AJ, Williams LT (1991). Well-defined growth factors promote cardiac development in axolotl mesodermal explants. *Development* 112, 1095-1101
- Nakase T, Takaoka K, Hirakawa K, Hirota S, Takemura T, Onoue H, Takebayashi K, Kitamura Y, Nomura S (1994). Alterations in the expression of osteonectin, osteopontin and Osteocalcin mRNAs during the development of skeletal tissues in vivo. *Bone Miner* 26, 109-122
- Nakayama Y, Takahashi K, Noji S, Muto K, Nishijima K, Taniguchi S (1990). Functional modes of Retinoic acid in mouse osteoblastic clone MC3T3-E1, proved as a target cell for Retinoic acid. *FEBS Lett* 261, 93-96
- Nanda A, Kaur S, Bhakoo ON, Kapoor MM, Kanwar AJ (1989). Fetal hydantoin syndrome: a case report. *Pediatr Dermatol* 6, 130-133
- Nau H, Rating D, Koch S, Hauser J, Helge H (1981). Valproic acid and its metabolites: placental transfer, neonatal pharmacokinetics transfer via mother's and clinical status of neonates of epileptic mothers. *J Pharmacol Exp Ther* 219, 768-777
- Nau H, Zierer R, Spielmann H, Neubert D, Gansau C (1981b). A new model for embryotoxicity testing: teratogenicity and pharmacokinetics of valproic acid following constant-rate administration in the mouse using human therapeutic drug and metabolite concentrations. *Life Sci* 29, 2803-2814
- Navone F, Jahn R, Gioia GD, Stukenbrok H, Greengard P, DeCamilli P (1986). Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol* 103, 2511-2527
- Neame PJ, Chritner JE, Baker JR (1986). The primary structure of link protein from rat chondrosarcoma proteoglycan aggregate. *J Biol Chem* 261, 3519-3535
- Neubert R, Merker HJ, Neubert D (1999). Developmental model for thalidomide action. *Nature Medicine* 4, 419-420
- Ng KW, Livesey SA, Collier F, Gummer PR, Martin TJ (1985). Effect of retinoids on the growth, ultrastructure and cytoskeletal structures of malignant rat osteoblasts. *Cancer Res* 45, 5106-5113
- Noda M, Rodan GA (1986). Type-beta transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline Phosphatase in murine osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 140, 56-65
- Nomura S, Wills AJ, Edwards DR, Heath JK, Hogan BLM (1988). Developmental expression of 2ar (osteopontin and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridisation. *J Cell Biol* 106, 441-450
- O'Brien TX, Lee K, Chien KR (1993). A morphogenetic field of MLC-2 gene expression in the primordial heart tube of normal and MLC-luciferase transgenic mice. *PNAS USA* 90, 5157-5161
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 59, 89-102
- Oldberg A, Franzen A, Heinegard D (1986). Cloning and sequence analysis of rat bone Sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *PNAS USA* 83, 8819-8823
- Oldberg A, Franzen A, Heinegard D (1988a). The primary structure of a cell-binding bone Sialoprotein. *J Biol Chem* 263, 19430-19432
- Oldberg A, Franzen A, Heinegard D, Pierschbacher M, Rouslathi E (1988b). Identification of a bone Sialoprotein receptor in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 263, 19433-19436
- Oldberg A, Jirskog-Hed B, Axelsson S, Heinegard D (1989). Regulation of bone Sialoprotein mRNA by steroid hormones. *J Cell Biol* 109, 3183-3186
- Oshima J, Watanabe M, Hirosumi J, Orimo H (1987). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> increases cytosolic Ca<sup>++</sup> concentration of osteoblastic cells, clone MC3T3-E1. *Biochem Biophys Res Commun* 145(2):956-960
- Otsuka E, Yamaguchi A, Hirose S, Hagiwara H (1999). Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid. *Am J Physiol* 277 (1 Pt1), C 132-138

- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89, 765
- Owen TA, Aronow MS, Barone LM, Bettencourt B, Stein GS, Lian JB (1991). Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell type phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology* 128, 1496-1504
- Oyamada Y, Komatsu K, Kimura H, Mori M, Oyamada M (1996). Differential regulation of gap junction protein (connexin) genes during mouse cardiomyocytic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Exp Cell Res* 229, 318-326
- Palmer G, Zhao J, Bonjour J, Hofstetter W, Caverzasio J (1999). In vivo expression of transcripts encoding the GLVr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development. *Bone* 24, 1-7
- Parman T, Wiley MJ, Wells PG (1999). Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nature Med* 5, 582-585
- Patarca R, Saavedra RA, Cantor H (1993). Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: The role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol* 13, 225-246
- Paulson RB, Sucheston ME, Hayes TG, Paulson GW (1985). Teratogenic effects of valproate in the CD-1 mouse fetus. *Arch Neurol* 42, 980-983
- Paulson OB, Newman EA (1987). Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 237, 896-898
- Pelton RW, Dickinson ME, Moses HL, Hogan BLM (1990a). In situ hybridisation analysis of TGF- $\beta$ 3 RNA expression during mouse development: comparative Studies with TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2. *Development* 110, 609-620
- Pelton RW, Hogan BLM, Miller DA, Moses HL (1990b). Differential expression of genes encoding TGFs- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 during murine palate formation. *Dev Biol* 141, 456-460
- Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI (1991). Immunohistochemical localization of *tgf- $\beta$ 1*, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol* 115, 1091-1105
- Perraud F, Labourdette G, Eclancher F, Sensenbrenner M (1990). Primary cultures of astrocytes from different brain areas of newborn rats and effects of basic fibroblast growth factor. *Dev Neurosci* 12, 11-21
- Peuckmann V, Fisch M, Bruera E (2000). Potential novel uses of thalidomide: focus on palliative care. *Drugs* 60, 273-292
- Plant A, Tobias JH (2001). Characterisation of the temporal Sequence of osteoblast gene expression during estrogen-induced osteogenesis in female mice. *J Cell Biol* 82, 683-691
- Poliard A, Lamblin D, Marie PJ, Buc-Caron MH, Kellermann O (1993). Commitment of the teratocarcinoma-derived mesodermal clone C1 towards terminal osteogenic differentiation. *J Cell Sci* 106, 503-512
- Price PA, Baukol SA (1980) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 255, 11660-11663
- Pringle GA, Dodd CM (1990). Immunoelectron microscopic localization of the core protein of decorin near the d and e bands of tendon collagen fibrils by use of monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 38, 1405-1411
- Przyborski SA, Morton IE, Wood A, Andrews PW (2000). Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTERA-2. *Eur J Neurosci* 12, 3521-3528
- Quarto R, Campanile G, Cancedda R, Dozin B (1992). Thyroid hormone, insulin and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis. *J Cell Biol* 119, 989-995
- Raouf A, Seth A (2000). Ets transcription factors and targets in osteogenesis. *Oncogene* 19, 6455-6463
- Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH (1993). Proliferation, differentiation and long-term culture of primary hippocampal neurons. *PNAS USA* 90, 3602-3606
- Reddi AH, Cunningham NS (1993). Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *J Bone Miner Res* 8, 499-502

- Reddi AH (1994). Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Gen Dev* 4, 937-994
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ (1992). Longterm proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359, 550-551
- Riew KD, Wright NM, Cheng S, Avioli LV, Lou J (1998). Induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene in a rabbit spinal fusion model. *Calcif Tissue Int* 63, 357-360
- Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An X-R, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT (1998). Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* 13 (7), 1101-1111
- Robbins J, Gulick J, Sanchez A, Howles P, Doetschmann T (1990). Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 265, 11905-11909
- Roberts AB, Sporn MB (1990). The transforming growth factor-betas. In: *Peptide growth factors and their receptors*. Sporn MB, Roberts AB, eds, pp 421-472. Springer Verlag, Heidelberg, Germany.
- Rodan GA (1995). Osteopontin overview. *Ann N Y Acad Sci* 760, 1-5
- Rohwedel J, Guan K, Wobus AM (1999). Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs* 165, 190-202
- Rohwedel J, Guan K, Hegert C, Wobus AM (2001). Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospect. *Toxicol in Vitro* 15, 741-753
- Rolletschek A, Chang H, Guan K, Czyz J, Meyer M, Wobus AM (2001). Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. *Mech Dev* 105, 93-104
- Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM (1990) A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345, 686-692
- Rudnicki MA, McBurney MW (1987). Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In: *Teratocarcinomas and Embryonic stem cells: A Practical Approach*. Robertson EJ (ed), IRL Press, Oxford, pp 71-112
- Rugh R (1990). *The mouse, its reproduction and development*. New York, Oxford University Press
- Ryan MC, Sandell LJ (1990). Differential expression of a cysteine-rich domain in the NH2-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen. *J Biol Chem* 265, 10334-10339
- Sakai Y, Rawson C, Lindburg K, Branes D (1990). Serum and transforming growth factor  $\beta$  regulate glial fibrillary acidic protein in serum-free derived mouse embryo cells. *PNAS USA* 87, 8378-8382
- Sakou T (1998). Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 22, 591-603
- Sanchez A, Jones WK, Gulick J, Doetschmann T, Robbins J (1991). Myosin heavy chain gene expression in mouse embryoid bodies. An in vitro developmental study. *J Biol Chem* 266, 22419-22426
- Sandell LJ, Goldring MB, Zamparo O, Wu J, Yamin R (1992). Molecular biology of type II collagen: new information in the gene. In: *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, Kuettner et al., eds, Raven Press, NY
- Sanger JW, Mittal B, Sanger JM (1984). Formation of myofibrils in spreading chick cardiac myocytes. *Cell Motil* 4, 405-416
- Sasano Y, Zhu JX, Kamakura S, Kusunoki S, Mizoguchi I, Kagayama M (2000) Expression of major bone extracellular matrix proteins during embryonic osteogenesis in rat mandibles. *Anat Embryol* 202, 31-37
- Sassoon DA, Garner I, Buckingham M (1988). Transcripts of  $\alpha$ -cardiac and  $\alpha$ -skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development (Camb.)* 104, 155-164
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heany S, Peteres H, Tang Z, Maxson R, Maas R (2000). Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat genet* 24, 391-395
- Sauer H, Günther J, Hescheler J, Wartenberg M (2000). Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals. *Am J Pathol* 156, 151-158

- Schachner M, Kim SK, Zehle R (1981). Developmental expression in the central nervous systems of oligodendrocyte cell surface antigens (O antigens) recognized by monoclonal antibodies. *Dev Biol* 83, 328-338
- Schmidt G, Hausser H, Kresse H (1991). Interaction of the small proteoglycan decorin with fibronectin. Involvement of the sequence NKISK of the core protein. *Biochem J* 280, 411-414
- Schmidt M, Guan K, Wobus AM (2001). Lithium influences differentiation and tissue-specific gene expression of mouse embryonic stem (ES) cells in vitro. *Int J Dev Biol* 45, 421-429
- Schmitz B, Thiele J, Kaufmann R, Witte O, Wickenhauser C, Kuhn-Regnier F, Fisher R (1995). Megakaryocytes and fibroblasts- interactions as determined in normal bone marrow specimens. *Leuk Res* 19, 629-637
- Schöler HR, Hatzopoulos Antikörper, Balling R, Suzuki N, Gruss P (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germ-line specific expression of an Oct factor. *EMBO J* 8, 2543-2550
- Scholz G, Pohl I, Seiler A, Bremer S, Brown NA, Piersma AH, Holzhütter HG, Spielmann H (1998). Ergebnisse der ersten Phase des ECVAM-Projekts zur Prävalidierung und Validierung von drei Embryotoxizitätstests. *ALTEX* 15, 3-8
- Scholz G, Pohl I, Genschow E, Klemm M, Spielmann H (1999). Embryotoxicity screening using embryonic stem cells in vitro: correlation to in vivo teratogenicity. *Cells Tiss Org* 165, 203-211
- Scott WJ, Fradkin R, Wilson JG (1977). Non-confirmation of thalidomide induced teratogenesis in rats and mice. *Teratology* 16, 333-336
- Scott JE (1988). Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J* 252, 313-323
- Sekiya I, Tsuji K, Koopmann P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M (2000). Sox9 enhances Aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by Retinoic acid in a cartilage derived cell line TC6. *J Biol Chem* 275, 10738-10744
- Shalhoub V, Aslam F, Breen E, van Wijnen A, Bortell R, Stein GS, Stein JL, Lian JB (1998). Multiple levels of steroid hormone-dependent control of osteocalcin during osteoblast differentiation: glucocorticoid regulation of basal and vitamin D stimulated gene expression. *J Cell Biochem* 69, 154-168
- Shaw G, Banker GA, Weber K (1985). An immunofluorescence study of neurofilament protein expression by developing hippocampal neurons in tissue culture. *Eur Cell Biol* 39, 205-216
- Shukunami C, Ohta Y, Sakuda M, Hiraki Y (1998). Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein.2 in chondrogenic cell line ATDC5. *Exp Cell Res* 241, 1-11
- Shuey DL, Lau C, Logson TR, Zucker RM, Elstein KH, Narotsky MG, Setzer RW, Kavlock RJ, Rogers JM (1994). Biologically based dose-response modeling in developmental toxicology: biochemical and cellular sequelae of 5-fluorouracil exposure in the developing rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 126, 129-144
- Si X, Jin Y, Yang (1998). Induction of new bone by ceramic bovine bone with recombinant human bone morphogenetic protein 2 and transforming growth factor  $\beta$ . *Int J Oral Maxillofac Surg* 27, 310-314
- Simionescu D, Iozzo RV, Kefalides NA (1989). Bovine pericardial proteoglycan: biochemical, immunochemical and ultrastructural studies. *Matrix*, 301-310
- Simler S, Ciesielski L, Maitre M, Randrianarisoa H, Mandel P (1973). Effect of sodium *n*-dipropylacetate on audiogenic seizures and brain  $\gamma$ -aminobutyric acid levels. *Biochem Pharmacol* 22, 1701-1708
- Sims NA, White CP, Sunn KL, Thomas GP, Drummond ML, Morrison NA, Eisman JA, Gardiner EM (1997). Human and murine Osteocalcin gene expression: conserved tissue restricted expression and divergent responses to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in vivo. *Mol Endocrinol* 11, 1695-1708
- Smith MK, Kimmel GL, Kochhar DM, Shepard SP, Spielberg SP, Wilson JG (1983). A selection of candidate compounds for in vitro teratogenesis test validation. *Teratogenesis, Carcinogenesis, Mutagenesis* 3, 461-480
- Sodek J, Zhang Q, Goldberg HA, Domenicucci C, Kasugai S, Wrana JL, Shapiro H, Chen J (1991). Non-collagenous bone proteins and their role in substrate-induced bioactivity. In: *The Bone-Biomaterial Interface*. Davies JE, ed. University of Toronto Press, Toronto, pp 97-110
- Somerman MJ, Prince CW, Sauk JJ, Foster RA, Butler WT (1987) Mechanism of fibroblast attachment to bone extracellular matrix: role of a 44 kilodalton bone phosphoprotein. *J Bone Min Res* 2(3):259-265



- Somerman MJ, Fisher LW, Foster RA, Sauk JJ (1988). Human bone Sialoprotein I and II enhance fibroblast attachment in vitro. *Calcif Tissue Int* 43, 50-53
- Spielmann H, Pohl I, Döring B, Moldenhauer F (1995). In vitro embryotoxicity assay using two permanent cell lines: mouse embryonic stem cells and 3T3 fibroblasts. Abstracts of the 23 ETS conference 1995, Dublin: *Teratology* 51(6), 31A-32A
- Spielmann H, Pohl I, Döring B, Liebsch M, Moldenhauer F (1997). The embryonic stem cell test (EST), an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. *In vitro Toxicol* 10, 119-127
- Spielmann H, Genschow E, Scholz G, Brown NA, Piersma AH, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K (2001). Preliminary results of the ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *ATLA* 29, 301-303
- Spielmann H, Scholz G, Pohl I, Genschow E, Klemm m, Visan A (2001b). The use of transgenic embryonic stem (ES) cells and molecular markers of differentiation for improving the embryonic stem cell test (EST). *Congenital anomalies* 40(Suppl), 8-18
- Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Faucheu C, Dunn F-W, Kawau S, Gallea S, Stiot V, Blanchet AM, Courtois B, Baron R, Rawadi G (2001). Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- $\beta$ 1 on osteoblast differentiation. *Bone* 29, 323-330
- Steedman HF (1950). Alcian Blue 8 GS: a new stain for mucin. *Q J Microsc Sci* 91, 477-479
- Steele CE, New DAT, Ashford A, Copping GP (1983). Teratogenic action of hypolipidemic agents: an in vitro study with postimplantation rat embryos. *Teratology* 28, 229-236
- Stein GS, Lian JB, Gerstenfeld LG, Shalhoub V, Aronow M, Owen T, Markose E (1989) The onset and progression of osteoblast differentiation is functionally related to cellular proliferation. *Connect Tissue Res* 20(1-4):3-13
- Stein GS, Lian JB, Owen TA (1990) Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 4(13):3111-3123
- Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL (1997). The osteocalcin gene: a model for multiple parameters of skeletal-specific transcriptional control. *Mol Biol Rep* 24, 185-196
- Steinert PM, Roop DR (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filament. *Annu Rev Biochem* 57, 593-625
- Stephens TD (1988). Proposed mechanisms of action in thalidomide embryopathy. *Teratol* 38, 229-239
- Stephens JD, Golbus MS, Miller TR, Wilber RR, Epstein CJ (1980). Multiple congenital anomalies in a fetus exposed to 5-fluorouracil during the first trimester. *Am J Obstet Gynecol* 137, 747-749
- Strauss PG, Closs EI, Schmidt J, Erfle V (1990). Gene expression during osteogenic differentiation in mandibular condyles in vitro. *J Cell Biol* 110, 1369-1378
- Strübing C, Ahnert-Hilger G, Jin S, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM (1995). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev* 53, 275-287
- Sucheston ME, Hayes TG, Paulson RB, King JE (1979). Fetal malformations in valproate sodium treated CD-1 mice. *Teratology* 19, 49A
- Sullivan FM, McElhatton PR (1977). A comparison of the antiepileptic drugs carbamazepine, clonazepam, ethosuximide, Phenobarbital, phenytoin and primidone in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 40, 365-378
- Suzuki A, Palmer G, Bonjour JP, Caverzasio J (2000). Stimulation of sodium-dependent phosphate transport and signalling mechanism induced by basic fibroblast growth factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 15, 95-102
- Takahashi I, Nuckolls GH, Takahashi K, Tanaka O, Semba I, Dashner R, Shum L, Slavkin HC (1998). Compressive force promotes Sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1 $\beta$  expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *J Cell Sci* 111, 2067-2076

- Takeuchi Y, Matsumoto T, Ogata E, Shishiba Y (1993). Effects of transforming growth factor beta 1 and L-ascorbate on synthesis and distribution of proteoglycans in murine osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 8, 823-830
- Tam PKH (1990). An immunohistochemical study of the human enteric nervous system with microtubule-associated proteins. *Gastroenterology* 99, 1841-1844
- Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Iwamoto Y, Yamada Y (2000). A zinc finger transcription factor,  $\alpha$ A-crystallin binding protein 1, is a negative regulator of the chondrocyte-specific enhancer of the  $\alpha$ 1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 20, 4428-4435
- Termine JD, Eanes ED, Conn KM (1980). Phosphoprotein modulation of apatite crystallization. *Calcif Tissue Int* 31, 247-251
- Termine JD, Robey PG (1996) Bone matrix proteins and the mineralization process. In: Favus MJ (ed) *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp24-28
- Thomas KR, Capecchi MR (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512
- Thomas KR, Capecchi MR (1990). Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* 346, 847-850
- Thomas L, Hartung K, Langosch D, Rehm H, Bamberg E, Franke WW, Betz H (1988). Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* 242, 1050-1052
- Thomas GP, Bourne A, Eisman JA, Gardiner EM (2000). Species-divergent regulation of human and mouse osteocalcin genes by calciotropic hormones. *Exp Cell Res* 258, 395-402
- Torii Y, Hitomi K, Tsukagoshi N (1994). L-ascorbic acid 2 phosphate promotes osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 mediated by accumulation of type I collagen. *J Nutr Sci Vitaminol* 40 (3), 229-238
- Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z (1993). SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodelling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol* 121, 1433-1444
- Tribiolo C, Lufkin T (1999). The murine Bapx1 homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen. *Development* 126, 5699-5711
- Tuckermann JP, Pittois K, Partridge NC, Merregaert J, Angel P (2000). Collagenase-13 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (Itm2a) are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of Itm2a, alkaline phosphatase, MMP-13 and Osteocalcin in the mouse. *J Bone Miner Res* 15 (7), 1257-1265
- Turksen K, Aubin JE (1991). Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J Cell Biol* 114, 373-384
- Turner S, Sucheston ME, De Philip RM, Paulson RB (1990). Teratogenic effects on the neuroepithelium of the CD-1 mouse embryo exposed in utero to sodium valproate. *Teratology* 41, 421-442
- Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, Nilsen J, Rhee J, Zhou M, Doetschmann T, Coffin JD, Wyland JJ, Hung YT (1999). Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci* 2, 848
- Van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Beer WB (1998). Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 6, 306-317
- Vary CP, Li V, Raouf A, Kitching R, Kola I, Franceschi C, Venzoni M, Seth A (2000). Involvement of Ets transcription factors and targets in osteoblast differentiation and matrix mineralization. *Exp Cell Res* 257, 213-222
- Vicario-Abejon C, Johe KK, Hazel TG, Collazo D, McKay RDG (1995). Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. *Neuron* 15, 105-114
- Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D (1984). Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 223, 587-597

- Watanabe H, Yamada Y (1995). Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities. *Nat Gen* 21, 225-229
- Wada T, Kagawa T, Ivanova A, Zalc B, Shirasaki R, Murakami F, Iemura S, Ueno K, Ikenaka K (2000). Dorsal spinal cord inhibits oligodendrocyte development. *Dev Biol* 227, 42-55
- Whittle BA (1976). Pre-clinical teratological studies on sodium valproate (Epilim) and other anticonvulsants. I: Legg NJ (ed): Clinical and pharmacological aspects of sodium valproate (Epilim) in the treatment of epilepsy. Turnbridge Wells: MCS Consultants, pp 105-110
- Wiedenmann B, Franke WW (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 8000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41, 1017-1028
- Wilda M, Bachner D, Just W, Geerkens C, Kraus P, Vogel W, Hameister H (2000). A comparison of the expression pattern of five genes of the family of small leucine-rich proteoglycans during mouse development. *J Bone Miner Res* 15, 2187-2196
- Wiles MV, Keller G (1991). Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 111, 259-267
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988). Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-686
- Wlodarczyk BC, Craig JC, Bennett GD, Calvin JA, Finnell RH (1996). Valproic acid-induced changes in gene expression during neurogenesis in a mouse model. *Teratology* 54, 284-297
- Wobus AM, Holzhausen H, Jäkel P, Schöneich J (1984). Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152, 212-219
- Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and CAE channel blockers. *Differentiation* 48, 173-182
- Wobus AM, Rohwedel J, Maltsev V, Hescheler J (1994). In vitro differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes or skeletal muscle cells is specifically modulated by retinoic acid. *Roux's Archives of Developmental Biology* 204, 36-45
- Wobus AM, Guan K, Shan J, Wellne MC, Rohwedel J, Guanju J, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM (1997). Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29, 1525-1539
- Wobus AM (2000). Potential of embryonic stem cells. *Molecular Aspects of Medicine* 22, 149-164
- Wozney JM, Rosen V, Celeste L, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534
- Wozney JM (1992). The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32, 160-167
- Wozney JM, Rosen V (1998). Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orth Rel Res* 346, 26-37
- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 9, 15-20
- Wuu YD, Pampfer S, Vanderheyden I, Lee KH, De Hertogh R (1998). Impact of tumor necrosis factor alpha on mouse embryonic stem cells. *Biol Reprod* 58, 1416-1424
- Xiao G, Cui Y, Ducy P, Karsenty G, Franceschi RT (1997). Ascorbic-acid dependent activation of the Osteocalcin promoter in MC3T3-E1 preosteoblasts: Requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence. *Mol Endocrinol* 11(8), 1103-1113
- Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland DW (1993). Increased expression of neurofilament subunit NF-L promotes morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73, 23-33
- Yaari Y, Selzor ME, Pineus JH (1986). Phenytoin : Mechanisms of its anticonvulsant action. *Ann Neurol* 20, 171-184

- Yamada T, Placzek M, Tanaka H, Dodd J, Jessell TM (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64, 635-647
- Yamada G, Kiousi C, Schubert FR, Eto Y, Chowdhury K, Pituello F, Gruss P (1994). Regulated expression of Brachyury (T), Nkx1.1 and Pax genes in embryoid bodies. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 552-563
- Yamaji N, Celeste AJ, Thies RS, Song JJ, Bernier SM, Goltzmann D, Lyons KM, Nove J, Rosen V, Wozney JM (1994). A mammalian serine/threonine kinase receptor specifically binds BMP-2 and BMP-4. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1944-1951
- Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E (1990). Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346, 281-284
- Yao KL, Todescan RJ, Sodek J (1994). Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralised tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. *J Bone Miner Res* 9, 231-240
- Yokota Y, Ohkubo H (1996). 9-*cis*-Retinoic acid induces neuronal differentiation of retinoic acid-nonresponsive embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 228, 1-7
- Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard A-M, Robey PG (1992). Structure, expression and regulation of the major noncollagenous matrix proteins in bone. *Clin Orthop* 281, 275-294
- Zehentner BK, Dony C, Burtcher H (1999). The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling. *J Bone Miner Res* 14, 1734-1741
- Zelent A, Mendelsohn C, Kastner P, Krust A, Garnier JM, Ruffenach F, Leroy P, Chambon P (1991). Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor  $\beta$  are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J* 10, 71-81
- Zernik J, Twarog K, Upholt WB (1990) Regulation of alkaline phosphatase and alpha 2(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. *Differentiation* 44(3):207-215
- Zhang CZ, Li H, Bartold PM, Young WG, Waters MJ (1995). Effect of growth hormone on the distribution of Decorin and Biglycan during odontogenesis in the rat incisor. *J Dent Res* 74, 1636-1643
- Zhang R, Ducy P, Karsenty G (1997) 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits Osteocalcin expression in mouse through an indirect mechanism. *J Biol Chem* 272(1):110-116
- Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, deCrombrughe B (1997). Parallel expression of Sox9 and Col2A1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* 209, 377-386
- Zou H, Wieser J, Massague J, Niswander L (1997). Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* 11, 2191-2203
- Zur Nieden NI, Ruf LJ, Kempka G, Hildebrand H, Ahr HJ (2001). Molecular markers in embryonic stem cells. *Toxicology In Vitro* 15, 455-461
- Zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ (2002). In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation*, eingereicht
- Zweyer M, Basa M, Martelli AM, Bareggi R (1994). Morphological and ultrastructural observations on mouse embryo chondrocytes cultured in vitro with and without ascorbic acid. *J Biol Res – Boll Soc It Biol Sper* 70, 11-17

## **Veröffentlichungen**

Auszüge aus dieser Dissertation wurden in folgenden Zeitschriften publiziert bzw. auf Kongressen in Vorträgen und Postern vorgestellt:

### **Publikationen**

Zur Nieden NI, Ruf LJ, Kempka G, Hildebrand H, Ahr HJ (2001). Molecular markers in embryonic stem cells. *Toxicology In Vitro* 15, 455-461

Zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ (2002). In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation*, in press

### **Poster**

Zur Nieden NI, Ruf LJ, Kempka G, Hildebrand H, Ahr HJ (2001) Molecular markers in embryonic stem cells. INVITOX 2000, Pueblo Acantilado, Alicante, Spanien

### **Vorträge**

Zur Nieden NI, Ruf LJ, Kempka G, Hildebrand H, Ahr HJ (2001) Molecular markers in embryonic stem cells. INVITOX 2000, Pueblo Acantilado, Alicante, Spanien

Zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ (2002). *In vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Osteoblasten. 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Informationen**

Name:	Nicole zur Nieden
Anschrift:	Friedensstr. 3, 42349 Wuppertal
Geburtsdag:	28. Juni 1974
Geburtsort:	Dortmund
Familienstand:	verheiratet
Mädchenname:	Melzer
Nationalität:	deutsch
Konfession:	römisch-katholisch
Eltern:	Vater: Josef Melzer, 1. November 1941 Mutter: Anni Melzer, 8. Oktober 1939

## **Schulbildung**

1980-1984	Grundschule Kamen, Nordrhein-Westfalen
1984-1993	Gymnasium, Kamen, Nordrhein-Westfalen, Germany
17.06.1993	Abitur, Gesamtnote 2,1

## **Studium**

Oktober1993-März 1999	Studium der Fachrichtung Biologie (Diplom) an der Ruhr- Universität Bochum, Gesamtnote 1,4
Februar 1998	Mündliche Diplomprüfung Zellbiologie                      Note 1,0 Humanbiologie                Note 1,0 Mikrobiologie                Note 2,0 Pharmakologie/Toxikologie    Note 1,7
März 1998-Februar 1999	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie (Prof. Dr. Dr. H. Hatt), Ruhr-Universität Bochum, in Kooperation mit dem Whitney Laboratory, University of Gainesville, Florida, USA Thema: 'molecular characterization of the cyclic nucleotide signalling pathway in the olfactory organ of invertebrates' Note 1,4
April 1999-ca. September 2003	Dissertation am Institut für Genetik (Prof. Dr. G. Obe), Universität-GH Essen, in Kooperation mit dem Zellbiologischen Labor der Forschungstoxikologie der Bayer AG, Wuppertal, unter der Leitung von Dr. G. Wasinska-Kempka Thema: 'Weiterentwicklung eines <i>in vitro</i> Embryotoxizitätstests mit murinen embryonalen Stammzellen: Verwendung molekularer Marker zur Erfassung verschiedener Differenzierungsendpunkte'

## **Stipendien**

März 1998- Oktober 1998	Reisekostenstipendium der SmithKline Beecham Stiftung
-------------------------	---

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. Nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Weiterentwicklung eines *in vitro* Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen: Verwendung molekularer Marker zur Erfassung verschiedener Differenzierungsendpunkte“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Nicole zur Nieden befürworte.

Essen, im Juli 2002

Prof. Dr. G. Obe

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Nicole zur Nieden, gem. §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. Nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, Juli 2002

Nicole zur Nieden

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Nicole zur Nieden, gem. §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. Nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, Juli 2002

Nicole zur Nieden